DIE PHOSPHOLIPASE B (LYSOLECITHINASE) DES HUMANSERUMS: CHARAKTERISIERUNG UND ANREICHERUNG

Franz-Herbert Hubmann

1972

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546016_0055

Max-Planck-Institut für Biochemie, München

Direktor: Prof. Dr. A. Butenandt

DIE PHOSPHOLIPASE B (LYSOLECITHINASE) DES HUMANSERUMS: CHARAKTERISIERUNG UND ANREICHERUNG

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades in der Humanmedizin
verfasst und der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Franz-Herbert Hubmann

München 1972

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. G. Ruhenstroth-Bauer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Butenandt

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Mündliche Prüfung: 18. Juli 1972

DISSERTATIONS – und FOTODRUCK FRANK oHG
8000 München 2 · Gabelsbergerstr. 15 · Tel.: 2 80 90 90

Das wissenschaftliche Wissen stösst auf Grenzen zweierlei Art.

Zunächst auf die Grenzen, die bei der Forschung jederzeit vorliegen und überschritten werden. Wenn ich die Grenzen überschreite in Gedanken, so ist das eine Hypothese, eine Möglichkeit, wie man sich auch ausdrückt unter Umständen: eine Extrapolation. Das sind nur Gedanken, die in der wissenschaftlichen Welt allein dann Bedeutung haben, wenn sie dazu führen, neue Untersuchungen und Experimente, Beobachtungen zu machen, die solche Extrapolationen oder Konstruktionen entweder widerlegen oder bejahen. Solange es nicht möglich ist, eine solche Entscheidung zu finden, haben diese Spekulationen für den wissenschaftlichen Menschen keine Bedeutung.

Die zweite Grenze der Wissenschaft ist anderer Art. Sie besteht nämlich darin, dass die Wissenschaften selber im Ganzen grundsätzlich beschränkt sind. Das ist auf folgende Weise deutlich zu machen: All unser Erkennen bleibt immer in der Welt, erreicht niemals die Welt. Die Welt ist kein Gegenstand der Forschung, sondern eine Idee, die die Forschung führt und auf Einheit richtet.

Karl Jaspers,
Vorlesung Sommersemester 1961.

Inhaltsübersicht:

A. Einleitung	Seite 1
B. Methodik	Seite 4
C. Charakterisierung der Phospholipase B (Lysolecithinase) des Humanserums und Substratcharakterisierung	Seite 33
D. Anreicherung der Phospholipase B (Lysolecithinase) des Humanserums	Seite 55
E. Besprechung	Seite 81
F. Zusammenfassung	Seite 87
G. Literaturverzeichnis	Seite 89

A. Einleitung

Lysolecithin (Lysophosphatidylcholin) ist ein im Tier- und Pflanzenreich weit verbreitetes Phospholipid mit hoher biologischer Aktivität. Da das Fettsäuremuster des Lecithins (Phosphatidylcholin) sich aus hochmolekularen gesättigten und ungesättigten Fettsäuren mischt und der ungesättigte Anteil vor allem in ß-Position, der gesättigte aber in α'-Position verestert ist (1,2,3,4,5), sind die Fettsäuren der Lysolecithine meistens abgesättigt (6,7). Die Lysophosphatidylcholine kommen nur in geringer Konzentration vor und entstehen physiologisch vor allem durch die Wirkung der Phospholipase A (Phosphatidylcholin-ß-Acylhydrolase, Lecithinase; EC 3.1.1.4) auf Lecithin (8). Die gesättigte Fettsäure in α'-Position kann durch die Phospholipase B (Lysophospholipase, Lysolecithin-Acylhydrolase, Lysolecithinase; EC 3.1.1.5) abgespalten werden unter Bildung von Glycerylphosphorylcholin (GPC). Das Lecithin hydrolysierende Enzym des Humanserums wurde durch seine Acyltransferierung auf Cholesterin als Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase (LCAT, Glomset-Enzym) charakterisiert (9,10).

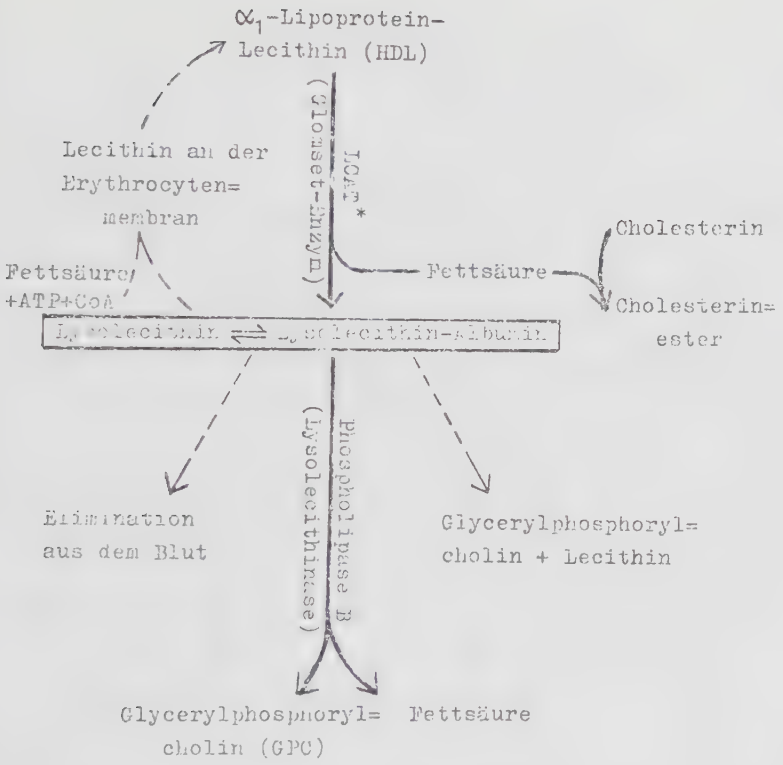
Die verschiedenen biologischen Wirkungen, die von Lysolecithin beschrieben worden sind, scheinen auf der Wirkung des Lysolecithins auf die Zellmembran zu beruhen. Als Reaktionspartner an der Membran werden das Cholesterin (11), Lecithin (12,13,14) und die Nichtlipidanteile der Membran (15) diskutiert. So findet man bei Lysolecithinkonzentrationen, die noch nicht zur Hämolyse führen, eine Beeinflussung der Natrium-Kalium-Pumpe der Membran mit Verminderung des aktiven Transports von Kalium- und Natrium-Ionen (16). Spermien zeigen eine Abnahme ihrer Beweglichkeit (17), die möglicherweise auf einer Membranalterierung mit Schädigung des Membranpotentials beruht. Die elektrophoretische Beweglichkeit von Ascites-Tumor-Zellen verringert sich zunehmend, je mehr Lysolecithin eingesetzt wird (18). Lysolecithin führt zu einer Hemmung der beschleunigten Blutkörperchensenkung (19), wobei als Ursache die zu beobachtende Sphärozytose (20,21) in Erwägung zu ziehen ist, die eine Agglomeration (22) verhindert.

Die Wirkung des Lysolecithins auf die Zellmembran besteht nicht nur in einer Alterierung, sondern bei Zunahme der Konzentration in einer Cytolyse. Diese ist sowohl bei Erythrocyten bekannt (23),

als auch als Mastzell-Lyse (24) und Histaminfreisetzung (25) beschrieben. Eine Zunahme der Lysolecithinmenge bewirkt eine proportional gehende Hemmung der Retraktionsfähigkeit von Thrombocyten; nach Überschreiten einer Schwellenkonzentration kommt es zur Zerstörung der Thrombocyten (26). Diese lytische Aktivität kann durch Inkubation mit Albumin oder Plasma durch Ausbildung des inaktiven Albumin-Lysolecithin-Komplexes neutralisiert werden. Geringste Mengen Lysolecithin (1 - 12 µg Lysolecithin/$2 \cdot 10^6$ Zellen/ml Hanks-Salzlösung) bewirken in vitro, in der Gewebekultur und in vivo eine starke Steigerung der Phagocytose (27), wobei die Lysolecithinkonzentration in vivo auf Grund der neutralisierenden Wirkung des Albumins höher liegen muss als in vitro. Diese geringen Lysolecithinkonzentrationen führen zu mikroskopisch sichtbaren "Undulationen" der Zelloberfläche, sowie zur Aussendung cytoplasmatischer Fortsätze, die mit jenen benachbarter Zellen zu einem Synzytium verschmelzen können. Diese durch Lysolecithin bedingte Zellfusion (28), die zur Ausbildung von Heterokaryonten führen kann, wurde elektronenmikroskopisch bestätigt. Es errechnet sich, dass $2 \cdot 10^{-6}$ µg Lysolecithin/Zelle bereits zu einer Zellfusion führen kann. Mit Konzentrationen von mehr als $10 \cdot 10^{-6}$ µg Lysolecithin/Zelle wird die Membran vieler Zellen zerstört.

Bei der Lysolecithin-Hypothese der Komplementwirkung wurde als terminales Endprodukt der Komplementreaktionskette, das letzten Endes direkt zur Schädigung der Zellmembran führt, Lysolecithin diskutiert (29,30). Lysolecithin sollte an C'3 gebunden sein und bei der Komplementaktivierung als cytolytisch wirkender Stoff freigesetzt werden (31,32,33). Ein genauer Wirkungsmechanismus ist jedoch noch nicht bekannt. Möglicherweise bewirkt das bei der Komplementaktivierung gleichsam in statu nascendi auftretende Lysolecithin an empfindlichen Stellen der Zelloberfläche eine räumlich umschriebene Schädigung der Membran. Gegen diese Vorstellung sind jedoch Widersprüche erhoben worden (131).

Die biochemischen Reaktionen des Lysolecithins ergeben zusammengefasst folgendes Schema für einen Lysolecithinzyklus im Blut (34,35,36,37,38):

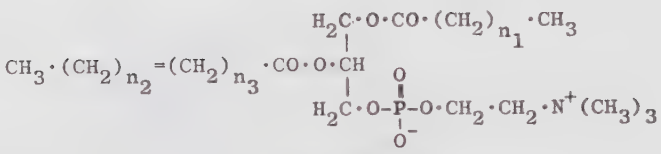


*) = Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase

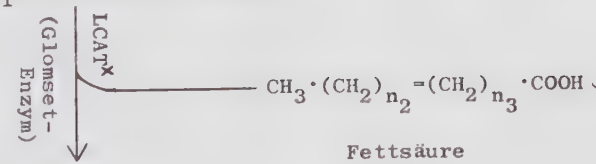
Inkubiert man Plasma oder Serum in vitro bei 37°, so ist der Zyklus gestört. Es laufen im wesentlichen nur die durchgezogen eingezeichneten Reaktionen ab. Die bei der Inkubation aus Lecithin freiwerdende Fettsäure wird auf Cholesterin übertragen unter Cholesterinesterbildung. Das entstandene Lysolecithin wird durch die Phospholipase B (Lysolecithinase) hydrolysiert zu Glycerylphosphorylcholin (GPC) und Fettsäure.

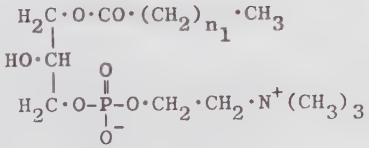
In der vorliegenden Arbeit wird versucht, die Phospholipase B (Lysolecithinase) des Humanserums anzureichern und zu charakterisieren.

Formelschema

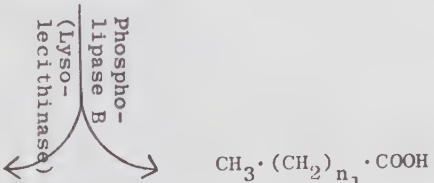


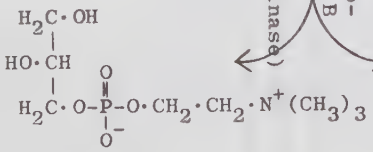
α_1-Lipoprotein-Lecithin



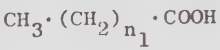


Lysolecithin

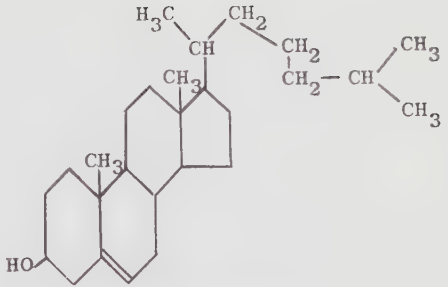




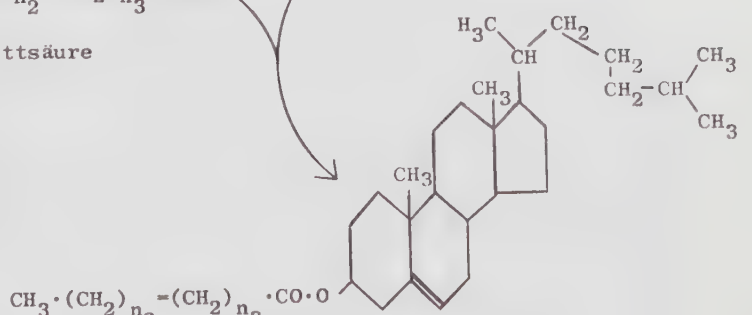
Glycerylphosphorylcholin (GPC)



Fettsäure



Cholesterin



Cholesterinester

x) = Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase

B. Methodik

B.I. Substanzen und Geräte

Substanzen:

Ammoniumsulfat für biochem. Zwecke: Merck AG (Darmstadt).
Agarose reinst: Serva (Heidelberg).
Amidoschwarz 10 B: Merck AG (Darmstadt).
Aluminiumoxid basisch (kationotrop) Aktivitätsstufe I: Woelm (Eschwege).
1-Amino-2-hydroxynaphthalinsulfonsäure-(4): Merck AG (Darmstadt).
N-Acetyl-DL-Homocysteinthiolacton puriss.: Fluka AG (Buchs/Schweiz).
(2-Aminoaethyl)-Hydrogensulfat: Schuchardt (München).
Ammoniummolybdat (Ammoniumheptamolybdat) pa: Merck AG (Darmstadt).
Barbital-Natrium (Natrium-Veronal) pa: Merck AG (Darmstadt).
Biochemica-Test-Combination Unveresterte Fettsäuren: Boehringer GmbH (Mannheim).
Calciumchlorid gepulvert rein; Calciumchlorid-6-hydrat krist. reinst; prim. Calciumphosphat-1-hydrat krist. reinst: Merck AG (Darmstadt).
Cialit: Asid-Institut GmbH (München-Lohnof).
Cystein für biochem. Zwecke: Merck AG (Darmstadt).
DC-Fertigplatten Kieselgel F_{254} (20 cm x 20 cm x 0,25 mm): Merck AG (Darmstadt).
Dowex-Ionenaustausch-Harz, Type 1x2, mesh: 50-100: Serva (Heidelberg).
Filter: Selecta-Faltenfilter Nr. 595 1/2, 12,5 cm Durchmesser; Filter 602 h: Schleicher + Schüll (Dassel).
Harnstoff pa; n-Hexan rein: Merck AG (Darmstadt).
Human-Albumin, trocken, reinst; Human-Globulin, trocken, reinst: Behringwerke AG (Marburg).
p-Hydroxymercuribenzoat (Natriumsalz): Sigma (St. Louis/USA).
Kaliumnatriumtartrat pa; Kieselsäure gefällt getrocknet: Merck AG (Darmstadt).
Aktivkohle pa; Kupfer(II)-sulfat gepulvert reinst: Merck AG (Darmstadt).
prim. Kaliumphosphat pa; sek. Kaliumphosphat wasserfrei reinst: Merck AG (Darmstadt).

Lysolecithin: Nutritional Biochemicals Corporation (Cleveland/USA).
2-Mercapto-aethanol puriss. pa: Fluka AG (Buchs/Schweiz).
Natriumchlorid pa; prim. Natriumphosphat reinst; sek. Natriumphosphat (di-Natrium-hydrogenphosphat-2-hydrat) pa: Merck AG (Darmstadt).
Natriumcitratlösung steril 3,8 %ig: Dr. E. Fresenius (Bad Homburg).
Natriumacetat-3-hydrat krist. reinst; Natriumdisulfit (Natriumpyrosulfit) pa; Natriumhydroxid-Plätzchen reinst; di-Natriumphenylphosphat pa; Natriumsulfit wasserfrei: Merck AG (Darmstadt).
Natronlauge-Fixanal: Riedel-De Haen AG (Seelze-Hannover).
Ölsäure rein: Merck AG (Darmstadt).
Perchlorsäure, etwa 70 %, pa: Merck AG (Darmstadt).
Phosphor-32 (Orthophosphat in verd. Salzsäure-Lösung, pH 2-3, sterilisiert, trägerfrei): Buchler + Co (Braunschweig).
Phospholipase A aus Crotalus terr. terr. für analyt. Zwecke (Lösung in 50-proz. Glyzerin, pH ca. 6): C. F. Boehringer (Mannheim).
PPO (2,5-Diphenyloxazol) für Szintillationsmessungen: Merck AG (Darmstadt).
Plasmaprotein-Antisera vom Kaninchen: Behringwerke AG (Marburg).
Quecksilber(II)-nitrat pa: Merck AG (Darmstadt).
Röntgenfilm Osray DW Blue Base: Agfa (München).
SAM: Seifenfabrik Dr. Schnell (München).
Sojabohnen: Ölwerke Spyck (Kleve).
Sephadex:Pharmacia Fine Chemicals AB (Uppsala/Sweden).
Thioharnstoff pa; Thymol krist.; Titriplex III (EDTA) pa;
Toluol pa: Merck AG (Darmstadt).
Triton X-100: Serva (Heidelberg).
Tris (2-Amino-2-hydroxymethyl-propandiol-1,3): Merck AG (Darmstadt).

Es wurde entmineralisiertes Wasser verwendet. Die organischen Lösungsmittel waren frisch destilliert bzw. vom Reinheitsgrad pa.

Geräte:

Amicon-Ultrafiltrationszellen; Diaflo-Ultrafiltrationsmembranen: Amicon N. V. (Oosterhout/Holland).
Beckman-Spektralfotometer-DU; Beckman-DB-Spektrofotometer: Beckman (München).

Chromatographiesäulen, Punktschreiber, Uvicord, Fraktionssammler: LKB-Produkter AB (Stockholm/Schweden).
Desaga-UGI-System zur Gel- und Immun-Elektrophorese: C. Desaga GmbH (Heidelberg).
Dialyseschläuche: Visking Company (Chicago/USA).
Eppendorf-Mikroliter-System: Eppendorf Gerätebau (Hamburg).
Hamilton-Mikroliter-Spritze: C. Hamilton Manufacturing AG (Bonaduz/Schweiz).
SL-30-Liquid-Scintillation-Counter: Deutsche Intertechnique GmbH (Mainz).
Lyophilisator L 2: WKF (Brandau/Odw.).
Mikrodensitometer: Joyce, Loeble + Co (Gateshead-on-Tyne/England).
MSE-High-Speed-18-Zentrifuge: Measuring and Scientific Equipment (London/England).
Osmometer: Knauer (Berlin).
Pasteur-Pipetten: J. G. Bachofer (Degerschlacht).
Rotationsverdampfer: Buchi (Flawil/Schweiz).
Servogor-RE-514-Kompensationsschreiber: J. G. Bachofer (Degerschlacht).
Ultrazentrifuge Omega II (70 000), Titanrotor 70: Martin Christ (Osterode/Harz).

B.II. Reinigung der Glaswaren

Die Glaswaren wurden nach der üblichen Vorreinigung 24 Stunden in eine 3 - 4 %ige SAM-Lösung gegeben. Nach der folgenden 24-stündigen Wasserung in fliessendem Leitungswasser und der dreimaligen Spülung mit destilliertem Wasser wurden sie bei 150° im Trockenschrank getrocknet.
Die Glaswaren, die für die Phosphorbestimmung nach Fiske-Subbarow und für die Bestimmung der freien Fettsäuren benötigt wurden, wurden nach der üblichen Vorreinigung 24 Stunden in Chromschwefelsäure gelegt. Nach der 24-stündigen Wässerung in fliessendem Leitungswasser wurden sie dreimal mit bidestilliertem Wasser gespült und bei 150° getrocknet.

B.III. Gewinnung von Mischserum

Aus dem Nativblut von gesunden Spendern beliebiger Blutgruppen (Blutbank) wurde durch zehnminütige Zentrifugation bei 1800 x g das Serum als Überstand gewonnen, abpipettiert und gemischt. Stark lipämische Seren wurden verworfen.

B.IV. Inkubation

Mischserum oder die bei der Enzymanreicherung daraus gewonnenen Fraktionen wurden bei 37° im Warmwasserschüttler für 22 Stunden gehalten.

B.V. Lipidextraktion aus Ansätzen

Die Extraktion der Lipide aus lyophilisierten Ansätzen erfolgte nach Habermann et al. in der von Debuch angegebenen Modifikation (39,40,41):
Nach der Inkubation bzw. ohne eine solche , wurden die Ansätze friergetrocknet. Anschliessend wurde die lyophilisierte Substanz soweit wie möglich mit 7 ml Methanol dest. gelöst. Dazu wurden 7 ml Chloroform dest. gegeben und nach kräftigem Mischen wurden die Proben 10 Minuten im Wasserbad bei 30° unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Nach der Zugabe von weiteren 7 ml Chloroform dest. wurde das Gemisch durch einen Faltenfilter in ein Schliffzentrifugenglas filtriert. Mit 10,5 ml Chloroform dest. : Methanol dest. = 2 : 1 wurde nachgewaschen und anschliessend am Rotationsverdampfer das organische Lösungsmittel abgedampft. Der Rückstand wurde mit 5 ml Chloroform dest. aufgeschwemmt. Es wurden 5 ml Petroläther dest. hinzugegeben und nach ausgiebigem Mischen wurde 10 Minuten bei 1800 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Spitzkölbchen dekantiert und der Bodensatz mit 10 ml Chloroform dest. : Petroläther dest. = 1 : 1 nachgewaschen. Der Lipidextrakt wurde dann am Rotationsverdampfer zur Trockne gebracht.

B.VI. Lipid-Dünnschichtchromatographie (42,43)

Die Auftrennung der Lipidextrakte aus den Ansätzen erfolgte dünnschichtchromatographisch mit DC-Fertigplatten-Kieselgel. Der Lipidextrakt im Spitzkölbchen wurde in 0,5 ml Chloroform dest. : Methanol dest. = 65 : 25 gelöst. Davon wurde mit einer Hamilton-Mikroliter-Spritze und Dosierer ein Punkt auf die Dünnschichtplatte aufgetragen. Ein Kaltföhn - im Abstand von ca. 40 cm seitlich oberhalb der Platte befestigt - beschleunigte das Trocknen der Auftragstelle. Die Platten wurden in eine Trennkammer gebracht, die mit dem Laufmittel (84 ml) mindestens vier Stunden vorher gefüllt worden war. Als Laufmittel fand Chloroform dest. : Methanol dest. : bidest. Wasser = 56 : 24 : 4 Verwendung. Die Laufzeit betrug zwei Stunden, die Steighöhe 18 cm. Nach dem Entfernen der Platten aus der Laufkammer wurden sie zum Trocknen waagerecht gelegt. Nach einigen Minuten wurde mit Joddampf unter einer Glasglocke angefärbt und die Lysolecithin- bzw. Lecithinbanden mit einer Nadel zur Markierung eng umstochen.

B.VII. Bestimmung von Lysolecithin und Lecithin mittels Phosphorbestimmung nach Fiske-Subbarow

Nach Lipidextraktion der lyophilisierten Ansätze und dünnschichtchromatographischer Auftrennung, wurden die Lysolecithinbanden und Lecithinbanden aus der Platte entnommen und nach Veraschung über die Phosphorbestimmung nach Fiske-Subbarow quantitativ erfasst.

1. Herstellung von Fiske-Subbarow-Reagens (44):

Samtliche Gläser wurden zuvor in Chromschwefelsäure gereinigt. In einem 100 ml Erlenmeyerkolben werden 6,85 g Natriumpyrosulfit (Natriumdisulfit) pa in 50 ml bidest. Wasser gelöst. Dazu gibt man 0,125 g 1-Amino-2-hydroxynaphthalinsulfonsäure-(4) und schüttelt, bis alles gelöst ist. In einem Reagenzglas werden 1,5 g wasserfreies Natriumsulfit in 5 ml bidest. Wasser gelöst und dann tropfenweise solange zur ersten Lösung gegeben, bis dort die Trübung verschwindet. Gebrauchsfertig ist die Lösung nach zweitägigem Stehen im Dunklen bis längstens zwei

Wochen. Die Lösung muss klar sein, notfalls muss sie vor Gebrauch gefiltert werden.

2. Phosphorbestimmung nach Fiske-Subbarow (45):

Die markierten Banden der Dünnschichtchromatographie wurden mittels einer Saugvorrichtung in phosphorfreie Schliffröhrchen, die in Chromschwefelsäure gereinigt worden waren, gebracht. Zur Erleichterung der Kieselgelentnahme wurden die DC-Platten vorher mit bidest. Wasser besprüht. Die Schliffröhrchen enthielten 0,7 ml 70 %ige Perchlorsäure pa. Die Röhrchen wurden nach Entnahme des Kieselgels kurz aufgeschüttelt und eine Veraschung im Aluminiumblock bei 180° über 45 Minuten durchgeführt. Nach dem Abkühlen wurden 4,6 ml einer 0,233 %igen Ammoniummolybdatlösung und 0,2 ml Fiske-Subbarow-Reagens zugesetzt. Anschliessend wurde gemischt und die Proben 10 Minuten im kochenden Wasserbad erhitzt. Ohne dass die Röhrchen abgekühlt waren, wurde für 5 Minuten bei 1800 x g das Kieselgel abzentrifugiert. Innerhalb von 45 Minuten wurde die Extinktion bei 830 nm mit dem Beckman-DU-Spektralfotometer gemessen gegen einen Leerwert, der entsprechend behandelt worden war. Für eine gute Reproduzierbarkeit ist reinlichstes Arbeiten Voraussetzung.

3. Berechnung der Lysolecithin- und Lecithinkonzentration:

Zur quantitativen Bestimmung des Phosphorgehaltes der aus der Platte entnommenen Probe wurde ihre Extinktion mit der einer Kontrollösung verglichen, die in 0,5 ml 2 µg Phosphor enthielt (32,8 mg di-Natriumphenylphosphat pa ad 1 Liter bidest. Wasser). Der Phosphorgehalt wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$P_p\left[\mu g\right] = 2 \frac{E_p}{E_K} \mu g$$

Hierbei bedeuten:

$P_p\left[\mu g\right]$ = Phosphormenge der aus der DC-Platte entnommenen Probe in µg.

E_p = Extinktion der Probe.

E_K = Extinktion der Kontrollösung.

Von der so bestimmten Phosphormenge der Probe wurde auf den Phosphorgehalt im Lysolecithin oder Lecithin des gesamten Ansatzes

hochgerechnet. Da jedes Lysolecithinmolekül und Lecithinmolekül jeweils nur ein Phosphoratom enthält, kann der für einen Ansatz bestimmte Lysolecithin-Phosphor und Lecithin-Phosphor, ausgedrückt in Mol, als molare Lysolecithinkonzentration und Lecithinkonzentration angegeben werden.
Bei Umrechnung der Gramm-Werte in Mol-Werte wird dem Lysolecithin ein Molekulargewicht von 519,71 und dem Lecithin ein Molekulargewicht von 794,19 zugrunde gelegt.

B.VIII. Herstellung von ^{32}P-Lecithin und ^{32}P-Lysolecithin mit Sojabohnen

Die Herstellung von ^{32}P-Lecithin und ^{32}P-Lysolecithin mit Sojabohnen erfolgte in Anlehnung an Hölzl und Wagner (46,47):
1. Gewinnung von ^{32}P-Sojabohnenlecithin:
Auf Sojabohnen im Trockengewicht von 30 g wurden 20 mCi $\pm$ 10 % trägerfreier Phosphor-32 in Form von Orthophosphat in 6 ml Lösung aufgetropft. Durch intensives Umschütteln wurden die Bohnen mit der Lösung gleichmässig benetzt und einschichtig auf dem Boden eines 1-Liter-Erlenmeyerkolbens verteilt. Nach etwa einer Stunde war die Flüssigkeit durch Quellung vollständig verbraucht. Mit 20 ml kaltem Leitungswasser wurden die noch an der Glaswand haftenden Reste von ^{32}P-Phosphat unter Zuhilfenahme einer Rekordspritze abgespült, die Bohnen durch Umschütteln gleichmässig mit dem Wasser befeuchtet und nach Verschliessen des Gefässes zur Keimung in einen Brutschrank mit der optimalen Keimtemperatur von 37^{o} gebracht. Sobald das Wasser verbraucht war, wurde erneut kaltes Leitungswasser in Mengen von 20 ml zugegeben. Während die spezifische Aktivität von ^{32}P-Lecithin mit der applizierten ^{32}P-Phosphat-Aktivität fast linear ansteigt und eine Beeinträchtigung des ^{32}P-Einbaus durch die hohe interne Strahlenbelastung offensichtlich nicht besteht, findet man hingegen eine Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der Sojabohnenphosphatide von der Inkubationszeit: bei einer Keimzeit von 30 Stunden ist der ^{32}P-Einbau in das Lecithin maximal. Nach 30-stündiger Ankeimzeit wurden die Bohnen in einem Mixer homogenisiert und anschliessend lyophilisiert.
Die Entfernung der Neutralfette erfolgte mit Aceton: die Soja-

bohnentrockensubstanz wurde mit 500 ml Aceton für eine Stunde vermischt und der Acetonextrakt entweder durch Zentrifugation abgetrennt oder durch einen mit Filterpapier belegten Büchner-Trichter durchgesaugt. Dieser Vorgang wurde zur weitgehenden Entfernung der Neutralfette noch dreimal wiederholt. Die Extraktion der Sojabohnenphosphatide erfolgte anschliessend durch dreimaliges Behandeln mit je 500 ml Chloroform : Methanol = 1 : 1. Das Sojabohnenhomogenat wurde mit dem Chloroform-Methanol-Gemisch für eine Stunde in einem Warmwasserbad von 40° vermengt und der Extrakt entweder abzentrifugiert oder durch einen Büchner-Trichter durchgesaugt. Diese Extrakte wurden vereint und am Rotationsverdampfer zur Trockenheit gebracht. - Zur Entfernung der wasserlöslichen Verunreinigungen wurde der Extrakt in 375 ml Chloroform aufgenommen und mit soviel bidest. Wasser versetzt (ca. 70 ml), dass sich nach dem Umschütteln zwei Phasen bildeten. Die Unterphase mit den Phosphatiden wurde zur Trockne eingeengt.

Die Isolierung des Lecithins aus dem Sojabohnenphosphatidgemisch erfolgte nach Rhodes und Lea (48) durch Aluminiumoxidchromatographie: 80 g Aluminiumoxid wurden mit Chloroform : Methanol = 1 : 1 vermischt. Nach dem Absetzen wurde die trübe Oberphase so häufig dekantiert, bis sie einigermassen klar war. Nach dem Entgasen wurde das Aluminiumoxid in einem Guss in eine mit einer Glasfritte und Filterpapier verschlossene Säule geschüttet und die Säulenpackung (Länge 20 cm, Durchmesser 2 cm) mit Chloroform : Methanol = 1 : 1 durchgesaugt. Der Sojabohnenextrakt, in 20 ml Chloroform : Methanol = 1 : 1 gelöst, wurde auf das Aluminiumoxid direkt aufgetragen. Nach dem Einsickern der Lösung wurde mit 750 ml Chloroform : Methanol = 1 : 1 eluiert. Das Eluat wurde am Rotationsverdampfer zur Trockenheit gebracht.—

Die Abtrennung der restlichen Neutralfette aus dem Lipidgemisch erfolgte nach Rouser et al. (49) mittels einer Kieselsäuresäule: 50 g Kieselsäure wurden mit soviel Chloroform : Methanol = 1 : 1 versetzt, dass sich gerade eine leicht flüssige Mischung ergab, der 7 ml 25 %iger Ammoniak zugesetzt wurden. Das Säulenmaterial wurde in einem Guss in eine mit Glasfritte und Filterpapier verschlossene Säule gegeben und die Säulenpackung (Länge 15 cm,

Durchmesser 2 cm) mit Chloroform durchgewaschen. Der Sojabohnenextrakt, in 20 ml Chloroform gelöst, wurde direkt auf die Kieselsäure gebracht. Anschliessend wurden mit 500 ml Chloroform die Neutralfette desorbiert. Die Elution von Lecithin erfolgte mit ca. 400 ml Chloroform : Methanol = 4 : 1 + 1,5 % bidest. Wasser. Das Eluat wurde am Rotationsverdampfer zur Trockne gebracht. Die dünnschichtchromatographische Überprüfung zeigte nach Jodanfärbung neben einer schwachen nicht phosphorhaltigen Front eine intensiv gefärbte Lecithinbande.

2. Abbau von ^{32}P-Sojabohnenlecithin zu ^{32}P-Sojabohnenlysolecithin:

Die Spaltung des ^{32}P-Sojabohnenphosphatidylcholins zu ^{32}P-Sojabohnenlysophosphatidylcholin erfolgte mit Phospholipase A aus Schlangengift (50):

^{32}P-Sojabohnenlecithin wird in 10 ml Diäthyläther gelöst. Dazu pipettiert man pro 10 mg Lecithin (Trockensubstanz) 0,05 ml Phospholipase A-Lösung und 0,025 ml 1 N $CaCl_2$-Lösung. Nach Verschliessen des Schliffglases mit Stopfen wird intensiv gemischt, der Stopfen mit einem Klebeband sicher fixiert und der Ansatz bei Zimmertemperatur für 18 Stunden stehengelassen. Zur Darstellung des entstandenen Lysolecithins wird zunächst der Äther am Rotationsverdampfer entfernt, wodurch ein visköser Rückstand verbleibt, welcher einer zweimaligen Lipidextraktion mit je 21 ml Chloroform : Methanol = 2 : 1 unterzogen wird. Nach dem Abdampfen der organischen Lösungsmittel erfolgt die Darstellung des Lysolecithins mittels einer Acetonfällung: Aceton fällt aus der Glyzerin-Wasser-Lösung das Lysolecithin, das sich als weisser schmieriger Bodenbelag von einer klar durchsichtigen Oberphase abzentrifugieren lässt. Die Oberphase wird dekantiert, das Lysolecithin getrocknet.

Die dünnschichtchromatographische Kontrolle zeigt eine mit Jod sich intensiv anfarbende Lysolecithinbande und eine schwache nicht phosphorhaltige Front.

Eine exakte Prüfung des Abbaus von ^{32}P-Sojabohnenlecithin zu ^{32}P-Sojabohnenlysolecithin mittels Phospholipase A aus Schlangengift wurde als "DC-Scanning" (Dünnschichtchromatographie-Scanning) durchgeführt, indem über die gesamte Laufstrecke der Dünnschichtchromatographie hinweg Kieselgelstreifen zu 1 cm

Breite entnommen und ihre ^{32}P-Aktivität im Liquid-Scintillation-Counter gemessen wurde. Die Impulse pro Minute (IpM) der Lysolecithinbande werden als 100 % angegeben, die übrigen Impulswerte in % des Lysolecithinwertes ausgedrückt.

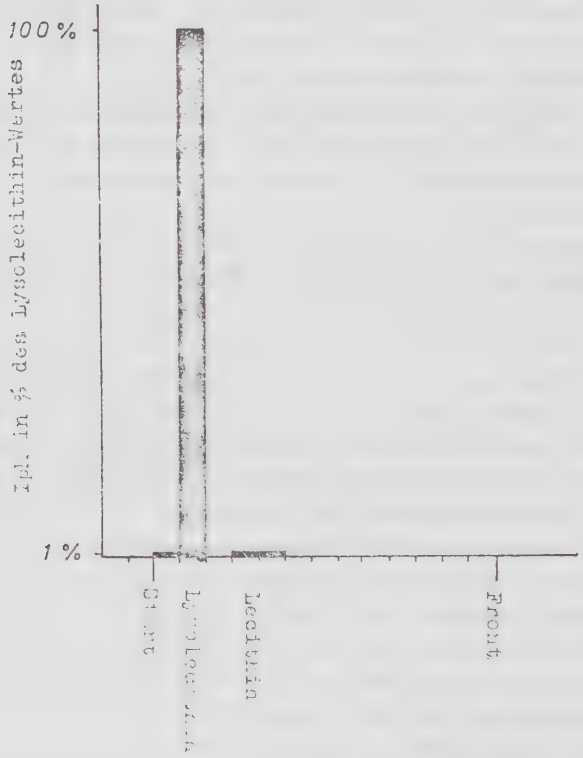


Abbildung 1: Kontrolle des Abbaus von ^{32}P-Sojabohnenlecithin durch Phospholipase A aus Crotalus terr. terr. und Reinheitsprüfung des präparierten ^{32}P-Sojabohnenlysolecithins mittels "DC-Scanning" (Dünnschichtchromatographie-Scanning).
Ergebnis: Die Spaltung des ^{32}P-Sojabohnenlecithins mit Phospholipase A aus Schlangengift erfolgt nahezu vollständig. Lediglich

beim Lecithin-R_f ist eine geringe ^{32}P-Aktivität zu registrieren, ebenso an der Auftragstelle. Diese Aktivitäten haben nur 1 % der Lysolecithinaktivität. Durch die scharfe Abgrenzung der Lysolecithinbande bei der Dünnschichtchromatographie können bei Entnahme des Kieselgels aus der Platte zur Zählung diese minimalen Verunreinigungen vollends ausgeschaltet werden.

3. Phosphor-32-Zählung mit dem Liquid-Scintillation-Counter:

Nach Lipid-Dünnschichtchromatographie auf DC-Fertigplatten-Kieselgel und Markierung der Banden mit Jod, wurden diese eng umstochen. Vor der Entnahme des Kieselgels aus der Platte muss diese zur Vermeidung einer Quenchung wieder jodfrei sein. Zum leichteren Abkratzen des Kieselgels wurden die markierten Stellen mit unvergälltem Äthanol besprüht und dann mittels einer Saugvorrichtung in Plastikfläschchen gesaugt, die 4 ml einer Lösung folgender Zusammensetzung enthielten: Methanol:Triton X 100:bidest. Wasser = 10:10:1. Anschliessend wurden 10 ml Szintillator hinzupipettiert (4 %ooige PPO-Toluol pa-Lösung). Nach dem Verschliessen der Fläschchen wurde kurzzeitig geschüttelt und einen Tag später, nachdem nun die markierten Phospholipide aus dem Kieselgel diffundiert waren, im Liquid-Scintillation-Counter gezählt.

B.IX. Bestimmung der wasserlöslichen Phosphorverbindungen (WPV)

Im Mischserum oder Ansatz werden nach Enteiweissung und Entfernung der fettlöslichen Phosphorverbindungen die wasserlöslichen Phosphorverbindungen (WPV) photometrisch nach Fiske-Subbarow bestimmt.

Der Ansatz wird mit 3 ml bidest. Wasser versetzt und mit der Hand aufgeschüttelt. Es werden 10 ml 99 %iges Äthanol pa hinzupipettiert und nach kräftigem Mischen wird das Eiweiss abzentrifugiert. Der klare Überstand wird in Schliffzentrifugengläser dekantiert. Anschliessend wird das Äthanol am Rotationsverdampfer vorsichtig abgedampft und das Wasser durch Gefriertrocknung entfernt. In 10 ml Methanol pa wird die grobkörnige Substanz gelöst und anschliessend das Methanol am Rotationsverdampfer entfernt. Die nun an der Glaswand fein verteilte Substanz wird mit 20 ml Äther pa : Chloroform pa = 1 : 1 aufgeschüttelt und für 10 Minuten bei 1800 x g zentrifugiert. Die flüssige Phase wird verworfen. Mit Methanol pa wird eine

Umschichtung der an der Glaswand befindlichen Substanz erreicht. Nach Wiederholung der Äther-Chloroform-Extraktion wird die verbliebene wasserlösliche Substanz am Rotationsverdampfer getrocknet, in bidest. Wasser aufgelöst und eine Phosphorbestimmung nach Fiske-Subbarow angeschlossen. Die Glaswaren müssen in Chromschwefelsäure gereinigt sein.

B.X. Photometrische Serumeiweissbestimmung mit dem Biuretreagens nach Weichselbaum (51,52,53,54)

Bei alkalischer Reaktion bilden Peptide und Eiweisskörper mit Kupfersalzen rotviolette bis rote Komplexverbindungen, die photometrisch bestimmt werden.

Harnstoff-Thymol-Lösung:

Harnstoff	300 g
Thymol	erbsgrosse Menge
Dest. Wasser	700 ml

Erhitzen

Aktivkohle	3 g

Gründlich schütteln und klar filtrieren (Filter 602 h).
Dest. Wasser ad 1 Liter.

Biuretreagens nach Weichselbaum:

Kaliumnatriumtartrat	9 g
0,2 N Natronlauge	400 ml

Lösen und unter Rühren zugeben:

Kupfer(II)-sulfat, gepulvert	3 g

Nach Lösung zugeben:

Kaliumjodid	5 g
0,2 N Natronlauge	ad 1 Liter.

In einem Reagenzglas gibt man 0,2 ml Serum zu 4,8 ml Harnstoff-Thymol-Lösung, versetzt mit 5 ml Biuretreagens, mischt gut durch und stellt für 10 Minuten in ein Wasserbad von $40^{o} \pm 3^{o}$. Genau 30 Minuten nach Zugabe des Biuretreagens photometriert man am Beckman-Spektralfotometer-DU bei 545 nm gegen einen Leerwert, der entsprechend behandelt wurde, aber anstelle 0,2 ml Serum 0,2 ml dest. Wasser enthält. Bei anderen Eiweisslösungen sind je nach ihrer Konzentration grössere oder kleinere Volumina mit Harnstoff-Thymol-Lösung auf 5 ml zu ergänzen.

Eichkurve:

0,5 g Eiweiss (Humanalbumin : Humanglobulin = 2 : 1) wurden in 10 ml physiologischer Kochsalzlösung gelöst und steigende Volumina dieser Eiweisslösung nach obiger Methode gegen einen Leerwert photometriert.

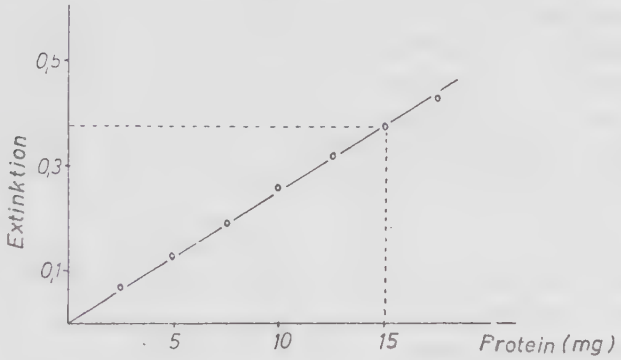


Abbildung 2: Eichkurve für die photometrische Serumeiweiss-bestimmung mit dem Biuretreagens nach Weichselbaum. Umrechnungsbeziehung: Einer Extinktion von 0,375 entsprechen 15 mg Protein.

B.XI. Bestimmung der Senkungsgeschwindigkeit der Erythrocyten nach Westergren (55)

Man saugt in eine kalibrierte Spritze 0,4 ml einer sterilen 3,8 %igen Natriumcitratlösung, entnimmt Venenblut bis Marke 2,0 und spritzt dann sofort den Spritzeninhalt in ein kleines Reagenzglas, schüttelt mehrere Male um und zieht in die hierfür bestimmte Westergren-Sedimentierungspipette bis zur Marke 0 auf. Die Pipette wird nun senkrecht in das Westergren-Gestell gebracht. Nach ein und zwei Stunden liest man die Höhe der Plasmaschicht ab.

B.XII. Bestimmung der Konzentration an unveresterten freien Fettsäuren (FFS)

Die im folgenden beschriebene Methode lehnt sich an die Angaben von W. G. Duncombe (56,57) an.

Prinzip: Unveresterte Fettsäuren bilden beim Schütteln mit Kupfernitratlösung in Chloroform lösliche Kupfersalze. Nach Trennung der wässerigen Phase und der Chloroformphase durch Zentrifugation und Entfernung der oberen wässerigen Schicht, erfolgt eine Kupferbestimmung in der unteren chloroformhaltigen Schicht. Als Reagens auf Kupfer wird Diäthyldithiocarbaminat verwendet. Die Intensität der hierbei entstehenden Farbe ist proportional der Konzentration an freien Fettsäuren und wird bei 450 nm gemessen.

Reagenzien:

Chloroform pa.

Lösung 1: Unveresterte Fettsäuren-Standard (0,5 µMol unveresterte Fettsäuren/ml).

Lösung 2: Kupfernitrat-Reagens (0,27 M Kupfernitrat, 0,45 M Triäthanolaminpuffer; pH 7,8).

Lösung 3: Chromogen (9 mM Diäthyldithiocarbaminat in Butanol).

Durchführung:

In 10 ml Zentrifugengläser (mit Glasschliffstopfen) pipettieren:

	Leerwert	Standard	Probe
Chloroform pa	5,0 ml	5,0 ml	5,0 ml
Lösung 1	-	0,2 ml	-
Bestimmungsansatz	-	-	0,5 ml
Lösung 2	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml

Drei Minuten kräftig schütteln, dann 15 Minuten mit Glasstopfen zentrifugieren. Wässrige blaugrüne Schicht (einschliesslich der Eiweisschicht bei der Probe) mit einer spitz ausgezogenen Pipette unter leichtem Wasserstrahlpumpenvakuum vorsichtig und möglichst vollständig absaugen.

In Reagenzgläser pipettieren:

	Leerwert	Standard	Probe
Chloroformschicht	2,0 ml	2,0 ml	2,0 ml
Lösung 3	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml

Beim Entnehmen der Chloroformschicht ist das Berühren der Wand des Zentrifugenglases mit der Pipettenspitze unbedingt zu vermeiden, damit keine Spuren der noch meistens vorhandenen wässerigen Schicht in die Pipette gelangen. Nach Entnahme Pipettenspitze aussen mit Filterpapier reinigen, dann Pipette so auslaufen lassen, dass die Pipettenspitze weder in die ausgelaufene Flüssigkeit eintaucht noch die Glaswand berührt. Entnommene Chloroformschicht und Lösung 3 mischen. Nach 10 Minuten Extinktion der Probe (E_{Probe}) und Extinktion des Standards ($E_{Standard}$) gegen Leerwert mit Glasküvetten (1 cm Schichtdicke, gereinigt mit Chloroform) bei 450 nm und Zimmertemperatur messen.

Berechnung: Bis zu einem Gehalt von 2,0 µMol unveresterte Fettsäuren/ml Bestimmungsansatz verläuft die Eichkurve linear. Die Berechnung basiert auf der Extinktion des Standards, der wie die unbekannte Probe behandelt worden ist:

$$\frac{E_{Probe}}{E_{Standard}} \times 0{,}2 = \text{µMol unveresterte Fettsäuren /1 ml Ansatz.}$$

B.XIII. Dialyse

Die Dialysen wurden bei 4^{o} (Kältelabor) gegen das 100-fache Volumen der zu dialysierenden Menge für 24 Stunden durchgeführt.

B.XIV. Salzaustauschchromatographie

Die schnelle Entfernung der hohen Salzmengen nach Ammoniumsulfatfällung von Mischserum wurde mittels Salzaustauschchromatographie an Sephadex-G-25-coarse durchgeführt. Sephadex-G-25-coarse wurde in physiologischer Kochsalzlösung

(pH 7,4) fünf Stunden gequollen, einigemale dekantiert und in eine Säule, deren Boden mit einem Filterpapier verschlossen war, gefüllt. Nach dem Absetzen und Durchwaschen der Säulenpackung (Länge 20 cm, Durchmesser 4,5 cm) mit physiologischer Kochsalzlösung (pH 7,4) wurde das mit Ammoniumsulfat gefällte Mischserum, das in wenig Kochsalzlösung aufgelöst worden war, direkt auf das Gel aufgetragen. Nach dem Einsickern der Proteinlösung wurde mit physiologischer Kochsalzlösung (pH 7,4) das Protein eluiert.

B.XV. Einengen einer Proteinlösung mittels Ultrafiltration

1. Der Auslauf eines Tropftrichters, über den ein schmaler angefeuchteter Dialyseschlauch gestülpt war, wurde mittels eines durchbohrten Gummistopfens so am Hals einer Saugflasche befestigt, dass der unten verschlossene Dialyseschlauch in die Saugflasche hing. Eine in den Trichter eingefüllte Proteinlösung konnte also in den Schlauch zulaufen. Zur Herstellung eines Unterdruckes wurde die Saugflasche an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen (58).
2. Bei der Konzentrierung grösserer Volumina wurde die Einengung mit den Amicon-Ultrafiltrationszellen durchgeführt (59):
In die Amicon-Ultrafiltrationszelle wurde eine entsprechende Diaflo-Ultrafiltrationsmembran, welche vorher mindestens 15 Minuten in einem Becherglas mit dest. Wasser gespült worden war, mit ihrer glänzenden Seite nach oben eingelegt und nach Schliessen des Scharnierschlosses die zu konzentrierende Proteinlösung eingegossen. Nach Einschrauben des Ventils und des Druckeinlassrohres wurde mit Stickstoff ein Druck von 5 atü erzeugt. Die Zelle wurde auf einen Magnetrührer gestellt und der Rührer so reguliert, dass eine gleichmässige Durchmischung erfolgte. Zur Überprüfung der Güte des Filters wurde der Ausfluss aus der Zelle in eine Trichloressigsäurelösung geleitet. Um ein Aufheizen der Ultrafiltrationseinheit durch den Magnetrührer zu vermeiden, kann noch ein Korkring dazwischen gelegt werden oder die Zelle in Eis gestellt werden. Nach Beendigung des Einengens wird die Kappe des Drucksicherheitsventils geöffnet, das Ventil gelöst und der Zelleninhalt herausgeschüttet bzw. mit einem auf eine Rekordspritze aufgesteckten dünnen PVC-Schlauch abgesaugt.

B.XVI. Elektrophorese und Immunelektrophorese

Die bei der Enzymanreicherung anfallenden enzymatisch aktiven Proteinfraktionen wurden mittels Elektrophorese und Immunelektrophorese (60,61,62,63) charakterisiert.

Reagentien:

Puffer: Stammlösung: 117,68 g Natrium-Veronal und 77,68 g Natriumacetat x 3 H_2O werden mit aqua bidest. ad 1 Liter gelöst. Zugesetzt werden ausserdem 100 mg Cialit als Bakteriozidicum. Stammpuffer, pH 8,2: Zu 100 ml Stammlösung werden 780 ml bidest. Wasser und 140 ml N/10 Salzsäure gegeben. Puffer zur Kammerfüllung: 1020 ml Stammpuffer und 510 ml bidest. Wasser werden zusammengegeben. Puffer zur Herstellung der Agaroselösung: Stammpuffer und aqua bidest. werden im Verhältnis 1 : 2 gemischt.

Agarose: 1,5 g Agarose werden mit 100 ml Puffer in einem siedenden Wasserbad solange erhitzt, bis alle Luftblasen hochgestiegen sind.

Antigene: An jede Auftragstelle werden 5 µl des mit Kochsalzlösung (pH 7,4) verdünnten (1:1 oder 1:2) Mischserums oder die enzymatisch aktiven Fraktionen G_1, G_1', H_2 und K_4 aufgetragen.

Antiserum: Antihumanserum vom Kaninchen: 200 µl je Rille.

Färbung und Differenzierung: Zum Färben wird eine 1 %ige alkoholische Amidoschwarzlösung benutzt (Amidoschwarz 10 B 10 g, Eisessig 70 ml, Methanol 300 ml, dest. Wasser ad 1 Liter). Lösung vor Gebrauch filtrieren. Die Differenzierung erfolgt mit 1 %iger Essigsäure in 70 %igem Methanol.

Durchführung:

Reinigung der Glastrennplatten: Die Glastrennplatten (9 cm x 12 cm) werden mit Wasser und Seife gereinigt, mit bidest. Wasser nachgespült und an der Luft getrocknet.

Ausgiessen der Agarose in die Geltrennkammer: Die seitlichen Verbindungsschlitze der Geltrennkammer werden unten mit einem Klebeband (Tesa-Film, Leukoplast) zugeklebt. Die Kammer soll exakt horizontal auf einem Nivelliertisch stehen. Es wird eine Glastrennplatte eingelegt und das giessfertige Gel (60 ml bis 80 ml) eingegossen, wobei durch leichtes Andrücken der Glasplatte mit einem Spatel etwaige Luftblasen zwischen Glas und Trennkammer

entfernt werden. Luftblasen an der Geloberfläche werden mit dem Schneidspatel entfernt. Die Kammer wird anschliessend mit einer Glasplatte bedeckt bis die Agarose erstarrt und stanzfertig ist (ca. 25 Minuten).
Stanzen des Gels: Die mit Gel ausgegossene Trennkammer wird von vorne in das Unterteil der Universal-Stanzbox eingeführt und das Gel mit einer Lochstanze unter Führung einer Schablone ausgestanzt.
Einbringen der Proben: Proben zu 5 µl werden mit einer Eppendorf-Pipette in die ausgestanzten Löcher gegeben.
Elektrophoretische Auftrennung: Nach Einbringen der Proben werden die Klebebänder der Trennkammer entfernt und diese auf dem Kühlblock in die Pufferbehälter des Desaga-UGI-Systems eingesetzt. Zehn Minuten vor Beginn der Auftrennung wurde die Wasserkühlung bereits in Betrieb gesetzt. Die Geltrennkammer bleibt mit einer Glasplatte bedeckt um ein Austrocknen zu verhindern. Auf dem Netzspeisegerät werden die gewünschte Auftrennzeit (2 Stunden) und die Spannung (90 V - 100 V) oder die Stromstärke (ca. 40 mA) eingestellt. Nach Abschluss der elektrophoretischen Auftrennung wird bei der Elektrophorese sofort angefärbt und anschliessend differenziert. Bei der Immunelektrophorese wird nach der elektrischen Auftrennung die Trennkammer erneut in die Stanzbox eingeschoben und die Stanzplatte nach unten gedrückt zum Ausstanzen der Längsrillen. Das ausgestanzte Gel wird mit einem Spatel entfernt. Die Glastrennplatte wird mit einem Spatel seitlich aus der Kammer gehoben und jede ihrer Längsrillen mit 200 µl Antihumanserum vom Kaninchen gefüllt. Die Geldiffusion in einer feuchten Kammer dauert zwei Tage. Danach werden die nicht präzipitierten Proteine durch Aufbewahren in physiologischer Kochsalzlösung für einen Tag ausgewaschen. Anschliessend wird in aqua bidest. gewässert. Das Trocknen der Agarose geschieht durch Abrollen eines nassen Filterpapiers auf das Gel. Die Elektrophorese bleibt solange liegen, bis sich das Papier von selbst abhebt.
Färben der Elektrophorese und Immunelektrophorese: Die Glasplatte wird 10 Minuten mit 1 %iger alkoholischer Amidoschwarzlösung angefärbt und anschliessend mit 1 %iger Essigsäure in 70 %igem Alkohol differenziert. Die Waschlösung wird wiederholt gewechselt. Nach zwei Tagen wird die angefärbte Elektrophorese in bidest. Wasser gespült und anschliessend an der Luft getrocknet.

B.XVII. Radiale Immundiffusion nach Ouchterlony

Zur immunologischen Identifizierung der angereicherten Enzymfraktion K_4 wurde die Geldiffusion nach Ouchterlony (Mikrotechnik) herangezogen (64,65,66):
Klar durchsichtige Plastikschälchen (Durchmesser 4,5 cm, Höhe 1,3 cm) wurden in Methanol gereinigt. Nach dem Trocknen wurden in die exakt horizontal gestellten Schälchen je 3 ml Agarose-Gel (Siehe B.XVI.) pipettiert, die Schälchen mit einer Glasplatte zum Schutze vor Austrocknung bedeckt und etwa 40 Minuten bis zur Erstarrung der Lösung stehengelassen. Unter Führung einer Schablone wurden sieben Löcher in das Gel gestanzt. 5 µl der Enzymfraktion K_4 und der verschiedenen spezifischen Plasmaprotein-Antisera (Anti - γG-Globulin - Serum, Anti - γA-Globulin - Serum, Anti - γM-Globulin - Serum, Anti - C-reaktives-Protein - Serum = Anti-CRP-Serum; jeweils vom Kaninchen) wurden in die Stanzlöcher gegeben. Nach ca. 30-stündigem Stehen in einer feuchten Kammer wurde nicht präzipitiertes Eiweiss in physiologischer Kochsalzlösung ausgewaschen und anschliessend wurde gewässert. Die Färbung und Differenzierung erfolgte analog der Agar-Elektrophorese.

B.XVIII. Ammoniumsulfatfällung von Mischserum (67,68)

Mischserum wurde mit Kochsalz-EDTA-Lösung (0,9 % NaCl + 0,1 % EDTA) auf einen Proteingehalt von 5 % verdünnt und mit einer 3,6 M Ammoniumsulfatlösung (= 90 %ige Sättigung), die mit 25 %igem Ammoniak auf pH 7,4 gebracht worden war, so fraktioniert, dass ein Niederschlag N_1 bei 1,12 M Ammoniumsulfat (= Ammoniumsulfatsättigung von 28 %) und ein weiterer Niederschlag N_2 bei 2,2 M Ammoniumsulfat (= Ammoniumsulfatsättigung von 55 %) erhalten wurde. Der Überstand wurde N_3 genannt.
Das Volumen der 3,6 M Ammoniumsulfatlösung, das zum Erreichen einer bestimmten Ammoniumsulfatsättigung zum Mischserum hinzugegeben werden musste, wurde nach folgender Formel berechnet:

$$Y = 100 \times \frac{A - B}{C - A} \quad ,$$

wobei Y das Volumen (in ml) der Ammoniumsulfatlösung der Sättigung C bedeutet, das zu 100 ml Proteinlösung der Sättigung B gegeben werden muss, um die Sättigung A zu erhalten.

Die Zugabe der Ammoniumsulfatlösung erfolgte tropfenweise (50 Tropfen/Minute) unter ständigem Rühren bei 4°. Nach Zugabe der Ammoniumsulfatlösung wurde noch eine Stunde im Kältelabor gerührt und anschliessend durch 20-minütiges Zentrifugieren in der MSE-Zentrifuge bei 4° und 12 000 UpM in Niederschlag und Überstand getrennt. Die Niederschläge N_1 (weiss,fest) und N_2 (braun, matschig) wurden in wenig physiologischer Kochsalzlösung gelöst und wie der Überstand N_3 (hellgelb, klar) 24 Stunden gegen isotonische Kochsalzlösung dialysiert, die 0,1 % EDTA enthielt und mit 1 N Natronlauge auf pH 7,4 gebracht worden war.
Wenn die Fraktion N_2 weiter aufgearbeitet werden sollte, wurde zum Salzaustausch statt der Dialyse die Salzaustauschchromatographie an Sephadex-G-25-coarse verwendet.

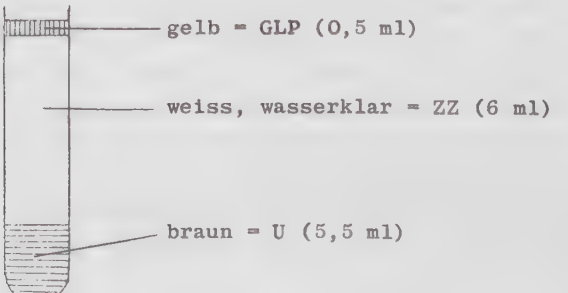
B.XIX. Ultrazentrifugation

Die präparative Darstellung der Gesamtlipoproteine und ihre Abtrennung vom enzymhaltigen Unterstand erfolgte durch Flotation bei erhöhter Dichte in der Ultrazentrifuge (69,70,71). Als Ausgangsmaterial wurde die durch Ammoniumsulfataussalzung erhaltene Fraktion N_2 verwandt.

1. Gewinnung der Gesamtlipoproteinfraktion (GLP) bis zur Dichte D = 1,210 g/ml:

Die Fraktion N_2, die durch Salzaustausch über Sephadex-G-25-coarse auf die Ausgangsdichte des Mischserums gebracht worden war, wurde auf die Dichte D = 1,210 g/ml eingestellt, indem 30,027 g Kaliumbromid in 100 ml N_2 gelöst wurden (30,027 g KBr/ 100 ml Gesamtvolumen). Anschliessend wurde 20 Stunden bei 68 000 UpM und bei einer Temperatur von 4° zentrifugiert.

Schichtung der Flotationsprodukte im Zentrifugenröhrchen:



GLP = Gesamtlipoproteinfraktion
ZZ = Zwischenzone
U = Unterstand

Als Lipoproteingesamtfraktion wurden je Röhrchen jeweils die obersten 0,5 ml mit einer Spritze abgehoben. Eine Austestung dieses Flotationsproduktes auf Lysolecithinaseaktivität wurde nicht durchgeführt und die Gesamtlipoproteinfraktion verworfen.

2. Gewinnung der Zwischenzone (ZZ):

1 ml der auf die gelbe Oberschicht folgenden Zwischenzone wurde verworfen. Die weisse wasserklare Zwischenzone wurde mit einer Spritze aus jedem Zentrifugenröhrchen entnommen und gesammelt und nach Einengen mittels Ultrafiltration anschliessend gegen eine 0,9 %ige Kochsalzlösung dialysiert, die 0,1 % EDTA enthielt und mit 1 N Natronlauge auf pH 7,4 eingestellt worden war.

3. Gewinnung des enzymhaltigen Unterstandes (U):

Der braune Unterstand wurde aus den einzelnen Zentrifugenröhrchen gesammelt und dialysiert, wie oben beschrieben.

B.XX. Chromatographie an Sephadex-G-200-superfine

Die Chromatographie der enzymatisch aktiven Fraktion U an Sephadex-G-200-superfine wurde in Anlehnung an Flodin und Killander (72,73,74,75) durchgeführt.

1. Vorbereitung des Säulenmaterials:

Trockenes Sephadex-G-200-superfine wurde zum Aufquellen mit reichlich bidest. Wasser versetzt und drei Tage bei 4^{o} aufbewahrt. Während dieser Zeit wurde mehrmals umgerührt und nach dem Absetzen des Gels dekantiert, die Hauptmenge der feinen Partikel abgegossen und frisches aqua bidest. dazugegeben.

2. Füllung der Säule mit Sephadex-G-200-superfine:

Zum Füllen wurde das gequollene Gel erneut dekantiert und mit 0,02 M Phosphatpuffer (pH 7,4) zu einem homogenen Brei aufgeschwemmt. Zur Entfernung von Luftblasen wurde das Sephadex im Exsikkator mit einer Pumpe evakuiert bis keine Luftblasen mehr hochstiegen. Die Säule, deren Dimensionen 100 cm x 2,5 cm waren, wurde senkrecht eingespannt und in einem Guss an einem eingehängten Glasstab entlang unter Vermeidung von Luftblasenbildung gefüllt (geringer Puffervorrat am Boden der Säule).

Nachdem sich das Gel einige Zentimeter abgesetzt hatte,wurde das Ende des Ausflusschlauches gesenkt und in dem Masse Puffer nachgegossen, wie es aus dem Schlauch tropfte. Falls die gewünschte Säulenhöhe noch nicht erreicht war, wurde erneut Gelsuspension nachgegossen. Anschliessend an die Säulenfüllung wurde 24 Stunden bei 4^{o} mit Puffer durchgespült. Der auf dem Sephadex-G-200 lastende Arbeitsdruck darf eine Höhe (Differenz zwischen Flüssigkeitsspiegel des Puffergefässes und Austropfstelle) von 15 cm nie überschreiten (76).

3. Auftragen der Substanz:

Die Fraktion U wurde eingeengt und gegen 0,02 M Phosphatpuffer (pH 7,4) bei 4^{o} für 24 Stunden dialysiert. Das über dem Sephadex stehende Elutionsmittel wurde grösstenteils entfernt und ein adäquater Auftragebecher auf das Gel gebracht. Nach Einsickern des überstehenden Puffers wurden 3 ml U mit 388,8 mg Protein tropfenweise mittels einer Rekordspritze, an die ein dünner PVC-Schlauch befestigt worden war, diffus auf das Gitter des Auftragebechers gebracht. Sobald die Substanz in das Sephadex eingedrungen war, wurden mit 1 ml Puffer die Wände des Auftragebechers abgespült. Im Anschluss wurde mit Elutionsmittel aufgefüllt, die Säule verschlossen und an das Puffergefäss angeschlossen.

4. Elution der Proteine:

Zur Elution wurde 0,02 M Phosphatpuffer (pH 7,4) verwandt. Die Sephadex-Packung hatte eine Länge von 90 cm und einen Durchmesser von 2,5 cm. Das Ausflussvolumen betrug 3,5 ml/Stunde bei einem Arbeitsdruck von 15 cm Wassersäule. Die Extinktion des Eluates wurde mittels Uvicord bei 254 nm gemessen.

B.XXI. Chromatographie mit dem Anionenaustauscher DEAE-Sephadex-A-50

Zur Auftrennung der Fraktion U wurde in Anlehnung an Gelotte et al. (77,78,79) DEAE-Sephadex-A-50 verwendet.

1. Vorbereitung des Säulenmaterials:

DEAE-Sephadex-A-50 wurde in aqua bidest. aufgeschwemmt. Man lässt es zwei Tage im Kältelabor quellen, wobei mehrmals nach dem Absetzen das überstehende Wasser abgegossen und durch frisches ersetzt wurde. Anschliessend wurde der Anionenaustauscher im

Büchner-Trichter auf Filterpapier unter Wasserstrahlpumpenvakuum entwässert und mit 0,5 N Natronlauge, bidestilliertem Wasser und 0,5 N Salzsäure nach folgendem Schema gewaschen:

	0,5 N NaOH	H_2O bidest.	0,5 N HCl	H_2O bidest.
1. Waschung	2 x 1 L.	2 l	1 L.	2 l
2. Waschung und 3. Waschung	1 L.	2 l	1 L.	2 l

Nach jedem Waschschritt wurde mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Nach Beendigung des Vorganges wurde das Sephadex mit 0,02 M Phosphatpuffer (pH 7,4) äquilibriert.

2. Füllung der Säule mit DEAE-Sephadex-A-50:

Der gewaschene Anionenaustauscher wurde wiederholt dekantiert und mit dem Ausgangspuffer erneut suspendiert. Anschliessend wurde er im Exsikkator evakuiert und zur Vermeidung von Luftblasenbildung an einem Glasstab entlang in das Chromatographierohr (Länge 50 cm, Durchmesser 2,5 cm) vorsichtig gegossen, auf dessen Boden sich geringe Mengen des Ausgangspuffers befanden. Nach dem Absetzen der breiigen Masse wurde der Säulenausfluss geöffnet. War die Füllung ausreichend, so wurde ein Adaptor auf das Gelbett gebracht und die Säule verschlossen. Das Gel wurde dann mit dem Ausgangspuffer für einen Tag durchgespült.

3. Auftragen der Substanz:

Nach Ultrafiltration von U und Dialyse gegen 0,02 M Phosphatpuffer bei 4° wurden 15 ml U mit 2160 mg Protein mit einer Pumpe auf die Säule aufgetragen.

4. Elution der Proteine:

Makromoleküle der Fraktion U, die nicht an das Säulenmaterial adsorbiert worden waren, wurden durch mehrstündiges Abwaschen mit dem Ausgangspuffer (0,02 M Phosphatpuffer) durchgespült und erschienen zuerst im Eluat. Die Desorption der gebundenen Komponenten erfolgte durch eine systematische Änderung der Ionenstärke in Form eines kontinuierlich-linearen Phosphatpuffergradienten steigender Molarität. Dazu wurde in ein Gefäss mit

700 ml Startpuffer (0,02 M Phosphatpuffer; pH 7,4; Osmolarität: 50 milliosmol) 1 Liter Grenzpuffer (0,2 M Phosphatpuffer; pH 7,4; Osmolarität: 400 milliosmol) geleitet und mittels eines Magnetrührers gemischt. Der lineare Gradient wurde erst dann angelegt, nachdem alle nicht an den Anionenaustauscher gebundenen Proteine eluiert worden waren. Die Sephadex-Packung hatte eine Länge von 37 cm und einen Durchmesser von 2,5 cm. Aufzutrennende Substanz und Puffer wurden mit einer Pumpe auf die Säule gebracht. Das Ausflussvolumen betrug 23 ml/Stunde. Die Extinktion wurde bei 254 nm am Uvicord gemessen.
Als Ausdruck für den Verlauf und die Anstiegssteilheit des Phosphatpuffergradienten wurde die Osmolarität jedes vierten Eluatröhrchens gemessen.

5. Bestimmung der Osmolarität des Eluats mit dem Osmometer:

Um die beim kontinuierlich-linearen Phosphatpuffergradienten auftretende steigende Ionenstärke aufzuzeigen, wurde von jedem vierten Ausflussröhrchen die Osmolarität in milliosmol mit dem Osmometer gemessen. Das Gerät wurde mit bidestilliertem Wasser auf 0 milliosmol und mit einer Eichlösung auf 400 milliosmol geeicht. Mit einer Eppendorf-Pipette wurden jeweils 100 µl des Eluats zur Messung herangezogen.

B.XXII. Chromatographie mit dem Kationenaustauscher CM-Sephadex-C-50

Die Fraktion U und die durch Ionenaustauschchromatographie von U am Anionenaustauscher DEAE-Sephadex-A-50 erhaltene Fraktion G_1 wurden auf dem Kationenaustauscher CM-Sephadex-C-50 aufgetrennt.

1. Vorbereitung des Säulenmaterials:

Die Vorbereitung von CM-Sephadex-C-50 ist ähnlich wie die von DEAE-Sephadex-A-50. Lediglich die Reihenfolge der Waschschritte ist verschieden. Der Kationenaustauscher CM-Sephadex-C-50 wird nach folgendem Schema gewaschen:

	0,5 N HCl	H_2O bidest.	0,5 N NaOH	H_2O bidest.
1. Waschung	2 x 1 L.	2 l	1 L.	2 l
2. Waschung und 3. Waschung	1 L.	2 l	1 L.	2 l

Während hier Natrium-Ionen Gegenionen sind, waren es beim Anionenaustauscher DEAE-Sephadex-A-50 Chlor-Ionen. Nach Beendigung des Waschvorganges wurde das Gel mit 0,02 M Phosphatpuffer (pH 7,4) ins Gleichgewicht gebracht.

2. Füllung der Säule mit CM-Sephadex-C-50:

Das so vorbereitete Säulenmaterial wurde wie DEAE-Sephadex-A-50 in die Säule gefüllt.

3. Auftragen der Substanzen:

Nacn dem Einengen von U und der Dialyse gegen 0,02 M Phosphatpuffer im Kältelabor wurden 7 ml U mit 1075 mg Protein mit einer Pumpe auf die Säule aufgetragen. Bei der weiteren Auftrennung der durch Chromatographie von U an DEAE-Sephadex-A-50 eluierten Fraktion G_1 wurde entsprechend verfahren. Hierbei wurde das gesamte Protein der Fraktion G_1 aufgetragen.

4. Elution der Proteine:

Die Proteine der enzymatisch aktiven Fraktionen U und G_1 wurden, wie bei DEAE-Sephadex-A-50 beschrieben, eluiert.

B.XXIII. Gelfiltration über Sephadex-G-150-superfine

Eine Auftrennung der enzymatisch aktiven und angereicherten Fraktion K_4 durch Gelfiltration über Sephadex-G-150-superfine wurde ähnlich der Fraktionierung mit Sephadex-G-200 durchgeführt. Die Vorbereitung des Säulenmaterials und die Füllung der Säule erfolgten wie bei Sephadex-G-200-superfine. Das Gel wurde mit 0,02 M Phosphatpuffer (pH 7,4) äquilibriert; die Säulendimensionen waren 150 cm x 2,6 cm. Bei einer Höhe von 131 cm wurde die Sephadex-Packung mit einem Adaptor verschlossen und mit 0,02 M Phosphatpuffer durchgespült. Während des Säulenlaufes wurde ein auf dem Sephadex-G-150-superfine lastender Arbeitsdruck von 10 cm Wassersäule nicht überschritten. Das Ausflussvolumen betrug 3 ml/Stunde (= Durchflussvolumen von 0,56 ml/cm^2/Stunde). Die Fraktion K_4 wurde über den Adaptor aufgetragen und mit 0,02 M Phosphatpuffer (pH 7,4) eluiert. Die Extinktion wurde bei 254 nm gemessen.

B.XXIV. Kationenaustauschchromatographie mit Calciumphosphat (Hydroxylapatit)

Die weitere Auftrennung der Fraktion K_4 wurde mit Calciumphosphat bei linear steigender Ionenstärke und pH-Änderung in Anlehnung an Tiselius et al. (80,81,82) versucht:

1. Herstellung und Vorbereitung des Säulenmaterials:

In 5 Liter dest. Wasser wurden 25,5 g $Ca(H_2PO_4)_2 \times H_2O$ (= 0,1 Mol) gelöst. Dazu wurden innerhalb von zwei Stunden 1 Liter 1,5 M K_2HPO_4-Lösung und 1 Liter 1,4 M $CaCl_2 \times 6\ H_2O$ - Lösung gleichzeitig unter Rühren zugetropft. Nach der Sedimentation von etwa 250 g $CaHPO_4 \times 2\ H_2O$ wurde der Überstand mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Der Niederschlag wurde dreimal mit je einem Liter dest. Wasser auf einem Büchner-Trichter gewaschen und anschliessend in 2,5 Liter 0,05 M Natronlauge suspendiert und bei 40° unter gelegentlichem Umrühren stehengelassen. Nach dem Absetzen des gebildeten Hydroxylapatits wurde der Überstand abgesaugt, erneut mit frischer 0,05 M Natronlauge aufgefüllt und bei 40° stehengelassen. Dieser Arbeitsgang wurde viermal wiederholt. Danach wurde auf einem Büchner-Trichter mit 0,005 M NaH_2PO_4-Lösung solange gewaschen, bis das pH des Waschwassers zwischen 6 und 7 lag. Vor der Verwendung des Hydroxylapatits wurde mit dem Ausgangspuffer gewaschen.

2. Füllen der Säule:

In eine Säule, deren Dimensionen 5o cm x 2,5 cm waren, wurde das mit dem Ausgangspuffer äquilibrierte und evakuierte Hydroxylapatit als dünner Brei gegossen. Nach dem Absetzen hatte die Säulenpackung eine Höhe von 33 cm, wurde mit einem Adaptor verschlossen und mit Ausgangspuffer durchgespült.

3. Puffer:

Ausgangspuffer: 0,005 M KH_2PO_4-Lösung + 0,2 M NaCl-Lösung; pH 5,0; Osmolarität: 355 milliosmol.

Startpuffer: 1 Liter Ausgangspuffer.

Grenzpuffer 1,5 l : 0,2 M Phosphatpuffer + 0,2 M NaCl-Lösung; pH 7,7; Osmolarität: 720 milliosmol.

4. Auftragen der Substanz:

Die gegen den Ausgangspuffer dialysierte Fraktion K_4 wurde über den Adaptor auf die Säule aufgetragen.

5. Elution der Proteine:

Die Säule wurde für einige Stunden mit Ausgangspuffer zur Entfernung der nicht an den Kationenaustauscher gebundenen Proteine durchgewaschen. Die Desorption der an das Säulenmaterial gebundenen Kationen erfolgte durch eine Änderung der Ionenstärke in Form eines linearen Phosphatpuffergradienten steigender Molarität. Dazu wurde in ein Gefäss mit 1 Liter Startpuffer 1,5 Liter Grenzpuffer geleitet und mit dem Magnetrührer gemischt. Die Extinktion wurde am Uvicord bei 254 nm gemessen.

B.XXV. Präparation einer nach freien SH-Gruppen trennenden Säule

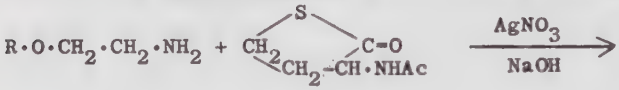
Die Phospholipase B (Lysolecithinase) des Humanserums besitzt freie SH-Gruppen (Siehe C.VIII.). Eine Abtrennung von SH-Proteinen aus der Fraktion K_4 mit einer nach Sulfhydrylgruppen auftrennenden Säule wurde deshalb zur weiteren Anreicherung des Enzyms herangezogen. Aus Sephadex-G-25-medium wurde auf folgendem Weg eine nach freien SH-Gruppen trennende Säule präpariert (83,84):
Der Ausgangsstoff Sephadex-G-25-medium (130 g) wurde in einem Guss unter Rühren eines Magnetrührers in eine alkalische Lösung von 2-Aminoäthylhydrogensulfat (NaOH 120 g, 2-Aminoäthylhydrogensulfat 40 g, bidest. Wasser 312 ml) geschüttet. Nach etwa einer Minute war das Gel zur Trockenheit erstarrt und wurde für 5 bis 6 Stunden bei einer Temperatur von 100° - 110° in einem Ofen vollends getrocknet. Das Sephadex verfärbte sich hierbei gelb und wurde spröde. Durch diesen Arbeitsschritt wurde das Sephadex zum Amino-Sephadex umgewandelt:

$$R \cdot OH + HSO_3 \cdot O \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot NH_2 \xrightarrow{NaOH} R \cdot O \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot NH_2$$

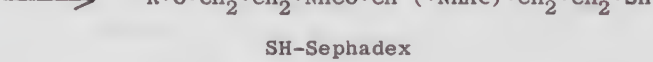
Sephadex — 2-Aminoäthylhydrogensulfat — Amino-Sephadex

Um das alkalische Milieu zu entfernen, wurde Amino-Sephadex mit bidest. Wasser mehrfach gewaschen, bis ein pH von 8 erreicht war. Im Anschluss wurde nach dem Absetzen des Gels die Oberphase dekantiert und die Thiolierung von Amino-Sephadex durch Zusatz einer N-Acetyl-DL-Homocystein-Thiolacton-Lösung (N-Acetyl-DL-Homocystein-Thiolacton 24 g, bidest. Wasser 1600 ml) durchgeführt,

indem bei Raumtemperatur das Amino-Sephadex mit dieser Lösung vermischt und kräftig gerührt wurde. Um ein pH von 7,5 aufrecht zu erhalten, wurden gleichzeitig über Büretten eine 1 N Natronlauge und eine 1 N Silbernitratlösung zugetropft bis zu einer Gesamtmenge von 151 ml Silbernitratlösung. Die Tropfenfolge war so eingestellt, dass unter laufender pH-Kontrolle das pH von 7,5 sich nicht veränderte, bis 151 ml 1 N Silbernitratlösung verbraucht waren. Die Lösung muss unter Rühren mehrere Stunden bei Raumtemperatur gehalten und fortlaufend vorsichtig mit 1 N Natronlauge versetzt werden, bis ein pH von 7,5 bestehen bleibt. Das Amino-Sephadex wurde dadurch übergeführt in SH-Sephadex:



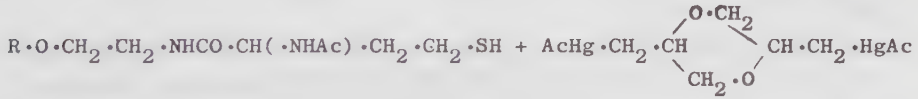
Amino-Sephadex N-Acetyl-DL-Homocystein-Thiolacton



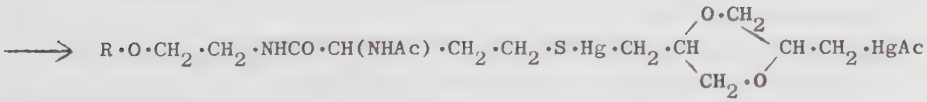
SH-Sephadex

Die Entfernung der Silberionen erfolgte mit einer konz. Thioharnstofflösung (280 g Thioharnstoff mit möglichst wenig bidest. Wasser) und 1 N Salpetersäure (500 ml), indem beide Lösungen successive zur Gelsuspension zugegeben und mit ihr vermischt wurden. Nach Absetzen des Gels und Dekantieren wurde das SH-Sephadex mit Thioharnstoff in verd. Salpetersäure (25 g Thioharnstoff, 750 ml bidest. Wasser, 10 ml 60 %ige Salpetersäure) nachgewaschen und mit 10 l bidest. Wasser auf einem Büchner-Trichter durchgespült und in Wasser bei 4° aufbewahrt.
Die Präparation der bifunktionellen Quecksilberverbindung (3,6-Bis-Acetatmercurimethyl-Dioxan) erfolgte folgendermassen: 49,5 g Quecksilber(II)-nitrat wurden in der geringsten Menge Salpetersäure (40 g rauchende Salpetersäure/l Liter) gelöst und im Wasserbad auf 50° erhitzt. Es wurden dann 10,5 ml Allylalkohol hinzugefügt und die Mischung nach Umschütteln für 30 Minuten bei 50° stehengelassen. Beim Abkühlen in einer Eispackung bildete sich ein weiss-kristallisches Präzipitat, das

mit Eiswasser gewaschen wurde. Nach der Sedimentation wurde das Präzipitat in der geringsten Menge 0,5 N Natronlauge gelöst und erneut präzipitiert, indem Salpetersäure solange vorsichtig zugetropft wurde, bis die weisse Trübung bestehen blieb. Nach dem Absetzen des Präzipitats wurde dieses auf einem Filterpapier getrocknet. Es wurde dann in einer möglichst geringen Menge Natronlauge gelöst und mit Wasser aufgefüllt, bis die Lösung 1 %ig war. Diese Lösung wurde durch eine Dowex-1-acetat - Säule aus der Nitratform in die Acetatform übergeführt und das Eluat mit Phosphatpuffer (Endkonzentration 0,01 M) auf ein pH von 7,6 eingestellt. Überschuss an kaltem Eluat mit gelöstem 3,6-Bis-Acetatmercurimethyl-Dioxan wurde dann zu einer kalten Suspension des SH-Sephadex zugegeben und 15 Minuten bei 4^{o} gerührt. Um eine bivalente Vernetzung durch die Quecksilberverbindung zu verhindern, ist es unbedingt erforderlich, diese im Überschuss zuzugeben. Das fertige Gel (Organo-Quecksilber-Polysaccharid) wurde wiederholt mit bidest. Wasser gewaschen und bei 4^{o} zum Gebrauch aufbewahrt.



SH-Sephadex 3,6-Bis-Acetatmercurimethyl-Dioxan



Organo-Quecksilber-Polysaccharid

C. Charakterisierung der Phospholipase B (Lysolecithinase) des Humanserums und Substratcharakterisierung

Die aufgeführten Versuche wurden mehrmals mit grundsätzlich gleichem Ergebnis wiederholt.

C.I. Nachweis der Lysolecithinaseaktivität im Mischserum

Mischserum, dem das Bakteriozidicum Cialit (1:10 000) zugesetzt worden war, wurde bei 37° für 22 Stunden inkubiert. Weitere Proben des Serums wurden als Kontrollansätze im Kältelabor bei 4° aufbewahrt. Aus den Inkubationsansätzen und Kontrollansätzen wurden - nach Friertrocknung, Lipidextraktion (Methode B.V.) und Dünnschichtchromatographie (Methode B.VI.) - der Lysolecithinabbau (Methode B.VII.) und als Ausdruck für das entstandene wasserlösliche Glycerylphosphorylcholin (GPC) die Zunahme der wasserlöslichen Phosphorverbindungen (Methode B.IX.) bestimmt.

Experimentelle Daten:

Kontrollansätze: 4°
Lysolecithin/ml Mischserum = 0,20 µMol LL/ml MS.
Lecithin/ml Mischserum = 1,59 µMol L/ml MS.
Wasserlösliche Phosphorverbindungen/ml Mischserum = 0,14 µMol WPV/ml MS.

Inkubationsansätze: 37°
Lysolecithin/ml Mischserum = 0,53 µMol LL/ml MS.
Lecithin/ml Mischserum = 1,12 µMol L/ml MS.
Wasserlösliche Phosphorverbindungen/ml Mischserum = 0,29 µMol WPV/ml MS.

Hieraus folgt:
Lecithinänderung = Δ L = 1,59 µMol/ml - 1,12 µMol/ml = - 0,47 µMol/ml.
Lysolecithinänderung = Δ LL = 0,53 µMol/ml - 0,20 µMol/ml = + 0,33 µMol/ml.

Ergebnis:
Lysolecithinabbau = 0,47 µMol/ml - 0,33 µMol/ml = 0,14 µMol LL/ml MS.
Zunahme der wasserlöslichen Phosphorverbindungen = 0,29 µMol/ml - 0,14 µMol/ml = 0,15 µMol WPV/ml MS.

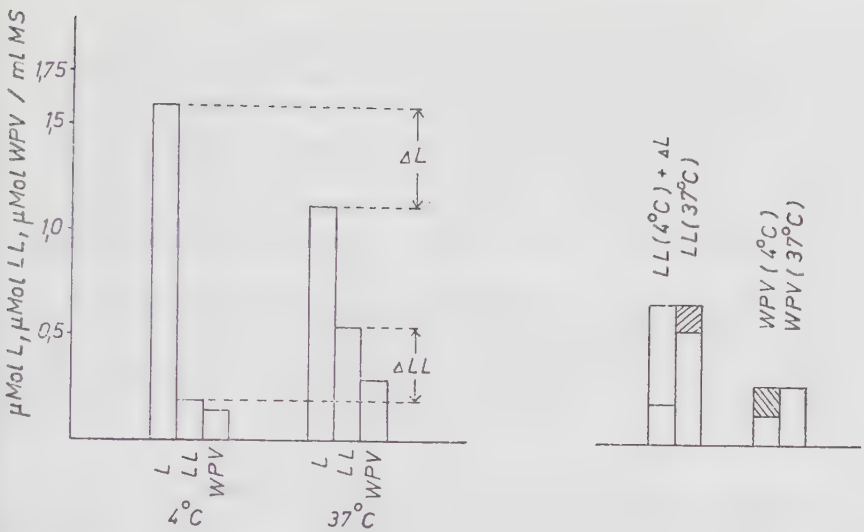


Abbildung 3: Lysolecithinabbau und Zunahme der wasserlöslichen Phosphorverbindungen im Mischserum bei Inkubation.

L = Lecithin
LL = Lysolecithin
WPV = Wasserlösliche Phosphorverbindungen
MS = Mischserum
ΔL = Lecithinabnahme
ΔLL = Lysolecithinzunahme
▨ = Lysolecithinabbau
▧ = Zunahme der wasserlöslichen Phosphorverbindungen

Ergebnis: Bei der Inkubation von Mischserum kommt es zu einem Abbau von Lecithin und zu einer Zunahme an Lysolecithin. Der Lecithinabnahme (Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase, LCAT, Glomset-Enzym) steht, durch die Wirkung der Phospholipase B (Lysolecithinase) des Humanserums bedingt, eine geringere Zunahme an Lysolecithin gegenüber: Lysolecithin wird durch die Phospholipase B des Humanserums gespalten in freie Fettsäure und wasserlösliches Glycerylphosphorylcholin (GPC). Die Erfassung des Glycerylphosphorylcholins erfolgt durch die Bestimmung der

wasserlöslichen Phosphorverbindungen.
Der Bilanzversuch zeigt, dass der Lysolecithinabbau und die Zunahme an wasserlöslichen Phosphorverbindungen fast identisch sind. Die Überprüfung des Abbaus weiterer Phospholipide im Serum durch Inkubation von Mischserum, wie etwa des Sphingomyelins und Kephalins, zeigt zu vernachlässigende Werte, sodass die Zunahme an wasserlöslichen Phosphorverbindungen bei der Inkubation fast ausschliesslich auf den Abbau der Cholinphosphatide zurückzuführen ist.
Aktivität der Phospholipase B (Lysolecithinase) im Mischserum:
$8{,}3 \times 10^{-5}$ µMol LL/mg Ew./Stunde bei 37° und pH 7,4.
Der Zahlenwert der Enzymaktivität ist bezüglich der Zeit der Durchschnittswert einer 22-stündigen Inkubation.

C.II. Lysolecithinkonzentration und Lysolecithinaseaktivität im Serum klinisch gesunder Männer, Frauen, Schwangeren und Wöchnerinnen in ihrer Beziehung zur Blutkörperchensenkung

Es ist bekannt, dass Frauen etwas höhere Senkungswerte im Vergleich zu Männern haben und dass die Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit klinisch gesunder Schwangeren und Wöchnerinnen gegenüber den Normalwerten eine eindeutige Beschleunigung aufweist (85,86,87).
Es wurde nun untersucht, ob eine Beziehung zwischen der Konzentration an Lysolecithin, einem Inhibitor der Blutkörperchensenkung (19,88), und der beschleunigten Senkung in der Schwangerschaft und post partum besteht.
Proben von Mischseren, denen Cialit (1:10 000) als Bakteriozidicum zugesetzt worden war und die von klinisch gesunden Männern, Frauen, Schwangeren und Wöchnerinnen stammten, wurden bei 37° für 22 Stunden im Schüttelinkubator inkubiert. Weitere Proben wurden als Kontrolle bei 4° aufbewahrt. Aus den Inkubationsansätzen und Kontrollansätzen wurden die Lysolecithinkonzentration, Lecithinkonzentration und die Lysolecithinaseaktivität ermittelt. Von den gleichen Probanden wurden Senkungen aufgezogen und die Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit nach Westergren (Methode B.XI.) bestimmt.
Abbildung 4 zeigt die mittlere Blutkörperchensenkung, die Lysolecithinkonzentration und die errechnte Lysolecithinaseaktivität bei klinisch gesunden Männern, Frauen, Schwangeren und Wöchnerinnen:

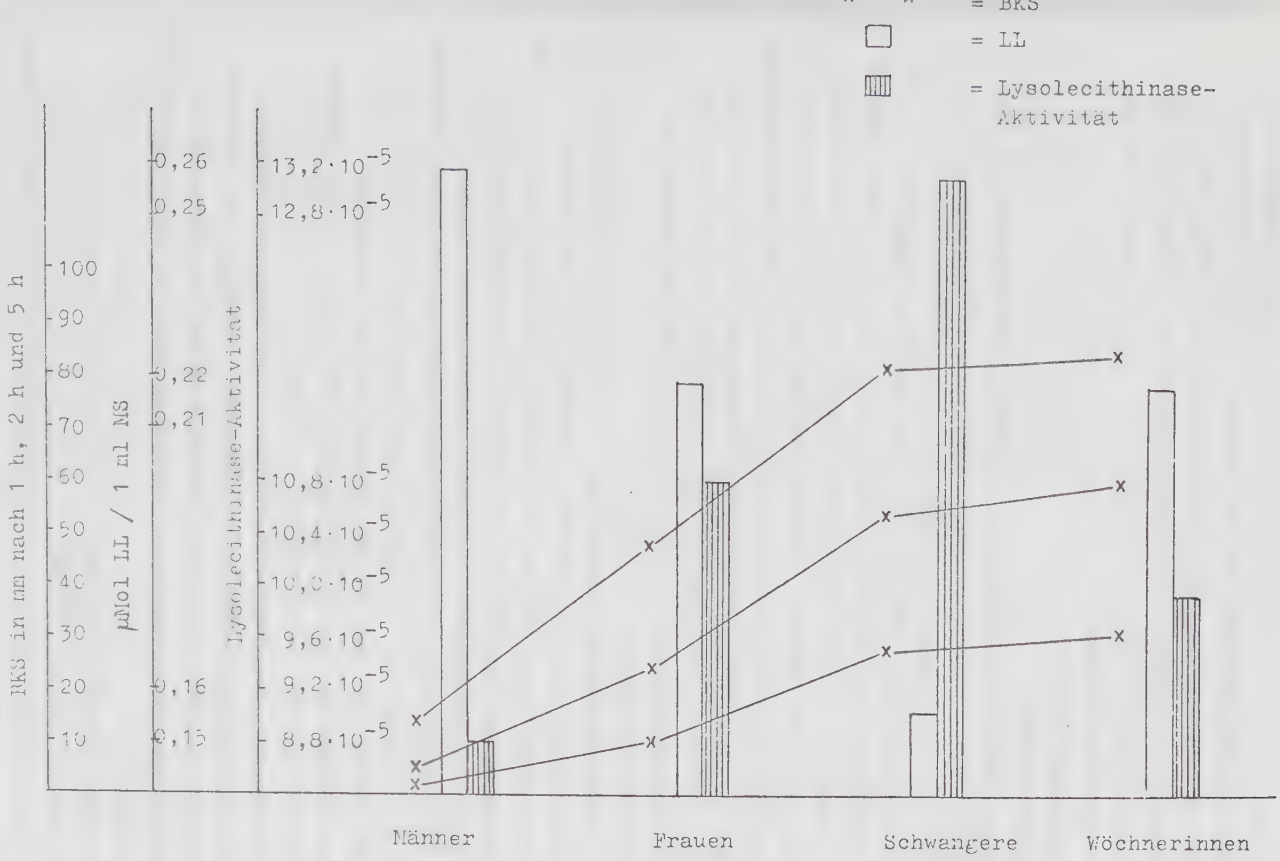

= BKS
= LL
= Lysolecithinase-Aktivität
BKS in mm nach 1 h, 2 h und 5 h
µMol LL / 1 ml MS
Lysolecithinase-Aktivität
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0,26
0,25
0,22
0,21
0,16
0,15
13,2·10⁻⁵
12,8·10⁻⁵
10,8·10⁻⁵
10,4·10⁻⁵
9,6·10⁻⁵
9,2·10⁻⁵
8,8·10⁻⁵
Männer
Frauen
Schwangere
Wöchnerinnen

Abbildung 4

Abbildung 4: Blutkörperchensenkung, Lysolecithinkonzentration und Lysolecithinaseaktivität bei Männern (n = 9), Frauen (n = 7), Schwangeren (n = 7; zwischen 38. Schwangerschaftswoche und 41. Schwangerschaftswoche) und Wöchnerinnen (n = 6; zwischen 6. Tag und 8. Tag post partum).
BKS = Blutkörperchensenkung
LL = Lysolecithin
MS = Mischserum

Ergebnis: Während bei Frauen die Lysolecithinkonzentration des Serums nur geringfügig gegenüber Männern erniedrigt ist, findet man bei klinisch gesunden Schwangeren ein eindeutiges Absinken des Lysolecithinspiegels. Ca. 7,5 Tage nach der Geburt hat sich der Lysolecithingehalt des Serums bereits wieder auf den Normalwert eingestellt. Adäquat der Schwankung der Lysolecithinmenge verhält sich die Lysolecithinaseaktivität: gegenüber Männern ist sie bei Frauen erhöht, um nach einem Maximum in der Schwangerschaft bei den Wöchnerinnen wieder in den Grössenbereich der normalen Frauen zu fallen. Der Anstieg der Lysolecithinaseaktivität in der Schwangerschaft führt zu einer signifikanten Senkung der Lysolecithinkonzentration im Serum.
Die erhöhte Blutkörperchensenkung der Frauen und Schwangeren geht mit einer gesteigerten Lysolecithinaseaktivität und daraus resultierender Verminderung der Lysolecithinkonzentration konform. Bei Wöchnerinnen findet man jedoch eine gegenüber Schwangeren nur geringfügig veränderte erhöhte Blutkörperchensenkung, obwohl der Lysolecithingehalt im Serum durch Rückgang der Lysolecithinaseaktivität wieder auf Normwerte angestiegen ist. Das Fehlen von Lysolecithin kann somit nicht allein für die gesteigerte Blutkörperchensenkung in der Schwangerschaft verantwortlich gemacht werden.
Als Sonderfall des Senkungsverlaufs in der Schwangerschaft ist folgende Einzelbeobachtung zu vermerken. Eine klinisch gesunde Schwangere zeigte am Ende der Schwangerschaft in ihrer Blutkörperchensenkung eine sehr starke Erhöhung in den ersten beiden Stunden:
BKS nach 1 Stunde: 62 mm,
BKS nach 2 Stunden: 75 mm.
In diesem Fall konnte in Erfahrung gebracht werden, dass es sich um eine Zwillingsschwangerschaft gehandelt hat.

C.III. Lysolecithinabbau und Zunahme an wasserlöslichen Phosphorverbindungen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer

Proben eines Mischserums, dem Cialit als Bakteriozidicum (1:10 000) zugesetzt worden war, wurden verschieden lang bei 37° inkubiert. Weitere Proben wurden bei 4° gehalten. Aus den Inkubationsansätzen und Kontrollansätzen wurden der Lysolecithinabbau und die Zunahme der wasserlöslichen Phosphorverbindungen bestimmt. Abbildung 5 zeigt das abgebaute Lysolecithin und die freigesetzten wasserlöslichen Phosphorverbindungen bei verschieden langer Inkubation von Mischserum im Warmwasserschüttler von 37°.

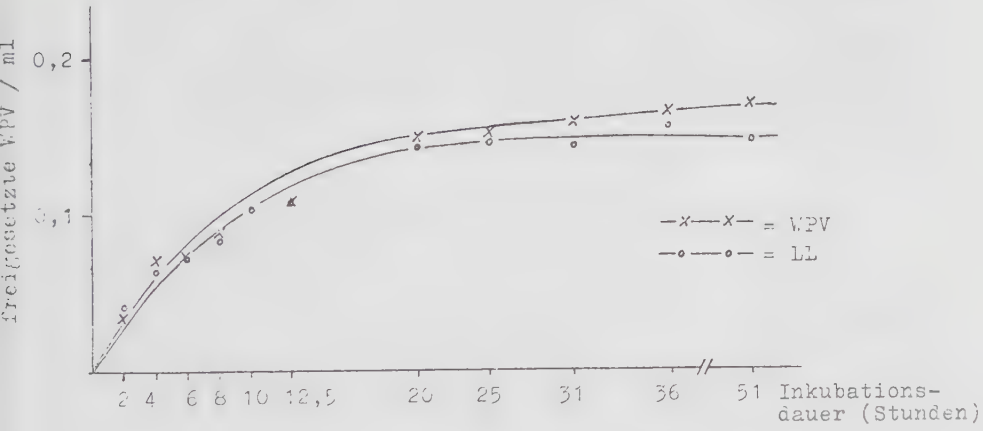


Abbildung 5: Abhängigkeit des Lysolecithinabbaues und der Freisetzung von wasserlöslichen Phosphorverbindungen von der Inkubationsdauer.
LL = Lysolecithin
WPV = Wasserlösliche Phosphorverbindungen
Ergebnis: Lysolecithin nimmt bis zu einer Inkubationsdauer von etwa 20 Stunden ab, während der Gehalt an wasserlöslichen Phosphorverbindungen gleichzeitig ansteigt. Eine längere Inkubationsdauer führt nur noch zu einer geringen Veränderung

der Lysolecithinkonzentration und der Konzentration an wasserlöslichen Phosphorverbindungen. Das abgebaute Lysolecithin entspricht den freigesetzten wasserlöslichen Phosphorverbindungen.

C.IV. Lysolecithinabbau und Bildung von freien Fettsäuren

Die phospholipidfreie und angereicherte Enzymfraktion U, nach Ammoniumsulfatfällung von Mischserum (Methode B.XVIII.) und Ultrazentrifugation bei erhöhter Dichte (Methode B.XIX.), wurde mit synthetischem Lysolecithin (synthetisches Lysolecithin in physiologischer Kochsalzlösung, pH 7,4) versetzt und teils bei 37° inkubiert, teils im Kältelabor gehalten. Mittels Phosphorbestimmung nach Fiske-Subbarow wurden das Lysolecithin und in Anlehnung an Duncombe die freien Fettsäuren (Methode B.XII.) bestimmt und in Abhängigkeit von der Inkubationszeit in Abbildung 6 aufgezeichnet.

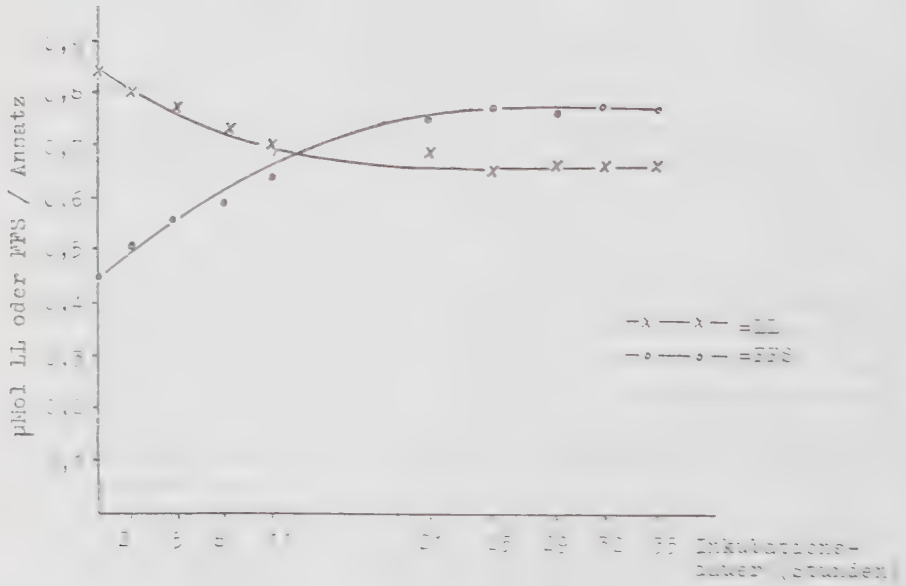


Abbildung 6: Einfluss der Inkubationsdauer auf die Lysolecithinkonzentration und auf den Gehalt an unveresterten Fettsäuren.
LL = Lysolecithin
FFS = Freie Fettsäuren
Ergebnis: Mit zunehmender Inkubationsdauer nimmt die Menge an Lysolecithin ab und die Konzentration an freien Fettsäuren zu. Nach einer Inkubationsdauer von 21 Stunden verändert sich der Gehalt an Lysolecithin und an freien Fettsäuren nur noch geringfügig.
Der Lysolecithinabnahme steht eine grössere Zunahme an freien Fettsäuren gegenüber. Ursache dafür ist, dass weder Enzym (Enzymfraktion C), noch Substrat (synthetisches Lysolecithin) in reiner Form vorliegen, sondern als Verunreinigung Fettsäureester enthalten, die bei Inkubation hydrolytisch gespalten werden. Der Nachweis dieser Fettsäurelieferanten erfolgte durch Dünnschichtchromatographie des enzymhaltigen Unterstandes C und der Lysolecithinlösung.

C.V. Einfluss der Wasserstoffionenkonzentration auf die Lysolecithinaseaktivität

Zum Nachweis der pH-Abhängigkeit des Lysolecithinabbaus wurden Proben der enzymhaltigen Fraktion C (Siehe C.IV.) mit synthetischem Lysolecithin versetzt und mit 0,1 M Essigsäure oder 0,1 M Trislösung auf verschiedene pH-Werte gebracht. Die Proteinkonzentration und Lysolecithinkonzentration der einzelnen Ansätze wurde konstant gehalten. Von allen Proben wurde eine Hälfte inkubiert, während die andere als Kontrolle bei 4° stand. Der Einfluss des pH auf die Enzymaktivität wird in Abbildung 7 wiedergegeben.

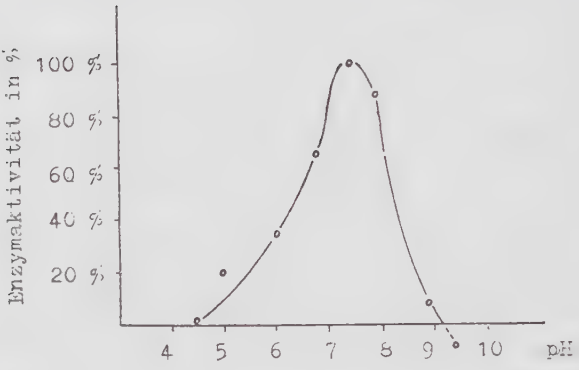


Abbildung 7: Abhängigkeit der Enzymaktivität vom pH des Ansatzes. Ergebnis: Das pH-Optimum der Phospholipase B (Lysolecithinase) des Humanserums liegt im physiologischen pH-Bereich. Der Abfall der Enzymaktivität ist bei einer Verschiebung des pH zur alkalischen Seite hin stärker als bei einer pH-Verschiebung zur sauren Seite.

C.VI. Hitzeinaktivierung der Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase (LCAT, Glomset-Enzym) und Phospholipase B (Lysolecithinase) des Humanserums

Die Wärmeempfindlichkeit der Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase (LCAT, Glomset-Enzym) und der Phospholipase B des Humanserums wurde mit ^{32}P-Sojabohnenlecithin und ^{32}P-Sojabohnenlysolecithin (Methode B.VIII.) ausgetestet. Mischserum, dem das Bakteriozidicum Cialit (1:10 000) zugesetzt worden war, wurde mit physiologischer Kochsalzlösung 1 : 2 verdünnt und davon Portionen zu 15 ml in Schliffgläsern mit Stopfen dicht verschlossen. Diese wurden für 20 Minuten in einen Warmwasserinkubator gegeben, wobei die Warmwassertemperatur für die verschiedenen Portionen fortlaufend um 5^{o} erhöht wurde. Nach 20-minütiger Hitzeexposition wurden sie sofort in das Kältelabor gebracht. Aus einer Probe wurden

sowohl Ansätze mit ^{32}P-Sojabohnenlecithin zur Bestimmung der Hitzestabilität der Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase, als auch Ansätze mit ^{32}P-Sojabohnenlysolecithin zur Bestimmung der Hitzeempfindlichkeit der Phospholipase B (Lysolecithinase) gemacht, die teils bei 37° im Schüttler inkubiert wurden , teils bei 4° im Kältelabor standen.
Abbildung 8 zeigt den Abbau von ^{32}P-Sojabohnenlecithin und den Abbau von ^{32}P-Sojabohnenlysolecithin nach 20-minütigem Hitzestress des mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnten Mischserums im Temperaturbereich von 42° bis 82°. Der jeweilige ^{32}P-Sojabohnenlecithin- und ^{32}P-Sojabohnenlysolecithinabbau ist ausgedrückt in % eines nicht hitzeexponierten Ansatzes.

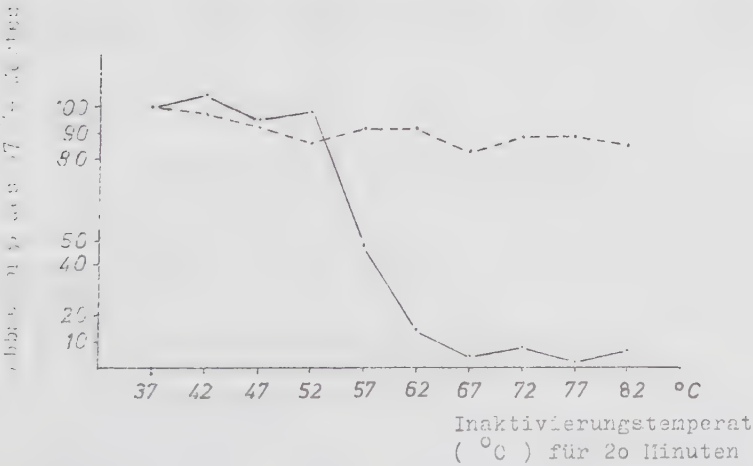


Abbildung 8: Hitzeinaktivierung der Lecithinase und Lysolecithinase des Humanserums.
——.——.—— : Phospholipase B (Lysolecithinase)
---.---.--- : Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase (LCAT, Glomset-Enzym)

Ergebnis: Der Versuch zeigt, dass lediglich die auszutestenden Enzyme hitzegestresst wurden, denn

die Substrate wurden erst nach der Hitzeexposition zugesetzt. Beide Enzyme unterlagen bei einer bestimmten Temperatur identischen Inaktivierungsbedingungen, da sie gemeinsam in dem mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnten Mischserum erhitzt worden waren.
Die Lysolecithinase und Lecithinase des Humanserums zeigen unterschiedliche Hitzestabilität: während die Phospholipase B (Lysolecithinase) durch Erhitzen für 20 Minuten zwischen 52^{o} und 62^{o} ihre Enzymaktivität verliert, bewirkt bei der Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase (LCAT, Glomset-Enzym) eine Temperatur von 82^{o} für 20 Minuten lediglich eine geringe Aktivitätseinbusse von ca. 20 %. Diese extreme Hitzestabilität scheint für sämtliche Phospholipasen A charakteristisch zu sein und wurde bei den Phospholipasen A verschiedenster Organismen bereits nachgewiesen (89,90,91,92,93,94).

C.VII. Einfluss von Harnstoff auf die Phospholipase B

Mischserum, dem Cialit (1:10 000) zugesetzt worden war, wurde zu gleichen Mengen in Dialyseschläuche abgefüllt. Jeweils zwei Portionen wurden in 2 M, 4 M, 6 M, 8 M und 10 M Harnstofflösung für 24 Stunden dialysiert. Anschliessend wurde jeweils eine dieser Proben für 24 Stunden gegen physiologische Kochsalzlösung (pH 7,4) zurückdialysiert. Aus den gegen die verschiedenen Harnstoffkonzentrationen dialysierten Mischseren wurden, ebenso wie aus jenen aus denen der Harnstoff wieder abdialysiert worden war, durch Zusatz von ^{32}P-Sojabohnenlysolecithin Inkubationsansätze und Kontrollansätze hergestellt.
Abbildung 9 zeigt die Enzymaktivitäten - in % eines nicht mit Harnstoff behandelten Ansatzes - von Proben, die mit 2 M bis 10 M Harnstoff behandelt worden waren und von solchen, aus denen der Harnstoff wieder abdialysiert wurde.

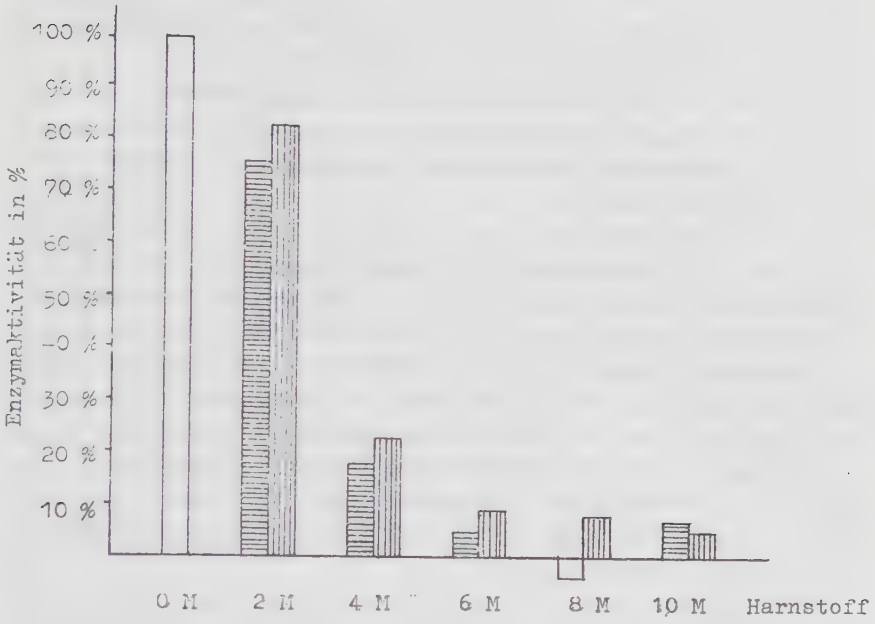


Abbildung 9: Einfluss von Harnstoff auf die Aktivität der Phospholipase B (Lysolecithinase).

□ = Enzymaktivität ohne Harnstoffbehandlung

▤ = Enzymaktivität nach Behandlung mit 2 M, 4 M, 6 M, 8 M und 10 M Harnstoff

▥ = Enzymaktivität nach Entfernung des Harnstoffs mittels Dialyse gegen physiologische Kochsalzlösung

Ergebnis: Harnstoff bewirkt eine irreversible Hemmung der Phospholipase B, die bei 4 M Harnstoff sehr ausgeprägt, bei 6 M Harnstoff fast komplett ist. Die Harnstoffdenaturierung lässt sich mit dem unbewaffneten Auge beobachten: 6 M Harnstoff und die höheren Konzentrationen führen zu einer durch Denaturierung bedingten Verfestigung des Mischserums, die auch nach Entfernung des Harnstoffs durch 24-stündige Dialyse gegen physiologische Kochsalzlösung nicht mehr rückgängig zu machen ist.

C.VIII. Nachweis essentieller freier SH-Gruppen (Sulfhydryl-gruppen) der Phospholipase B (Lysolecithinase)

Es wurde versucht das Vorhandensein essentieller freier SH-Gruppen im Enzym nachzuweisen durch Enzyminhibition mit dem SH-Gruppen-Blocker p-Hydroxymercuribenzoat und Reaktivierung mit 2-Mercaptoäthanol.
Die enzymatisch aktive und angereicherte Fraktion G_1' (Siehe D.VI.) wurde dialysiert gegen Kochsalz-EDTA-Lösung (pH 7,4) und mit synthetischem Lysolecithin versetzt. Hieraus wurden Ansätze mit steigenden Mengen an p-Hydroxymercuribenzoat erstellt, denen teilweise 2-Mercaptoäthanol zugesetzt wurde. Die Ansätze mit p-Hydroxymercuribenzoat und jene, die zusätzlich 2-Mercaptoäthanol enthielten, wurden als Inkubationsansätze bei 37° geschüttelt und als Kontrollansätze im Kältelabor gehalten. Die Wirkung von p-Hydroxymercuribenzoat und 2-Mercaptoäthanol auf die Lysolecithinase des Humanserums gibt die Abbildung 10 wieder.

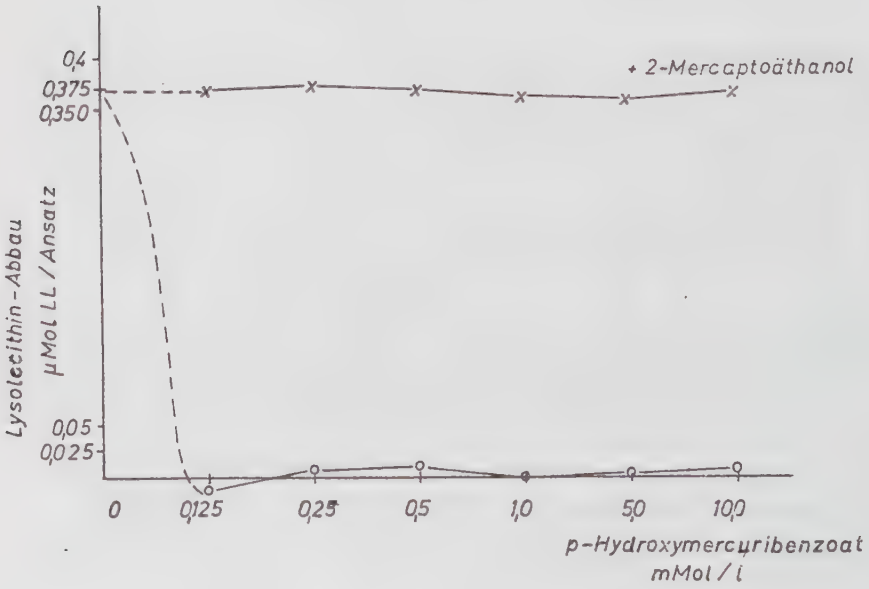


Abbildung 10: Enzyminhibition durch p-Hydroxymercuribenzoat und Aufhebung der Hemmwirkung durch 2-Mercaptoäthanol.
LL = Lysolecithin
—o———o— : Lysolecithinabbau nach Zusatz von p-HMB.
—x———x— : Lysolecithinabbau nach Zusatz von p-HMB (p-Hydroxymercuribenzoat) und 2-Mercaptoäthanol.
Ergebnis: Die Lysolecithinase besitzt essentielle freie SH-Gruppen: bereits die geringste Konzentration an p-Hydroxymercuribenzoat zeigt eine vollständige Hemmung der Enzymwirkung. Die Enzyminhibition ist reversibel: 2-Mercaptoäthanol hebt die Hemmwirkung von p-Hydroxymercuribenzoat auf. Die enzymatisch aktive Fraktion G_1' enthält nur sehr wenig Proteine mit freien SH-Gruppen, da p-Hydroxymercuribenzoat bereits in minimaler Konzentration vollständig hemmt. Geringere Konzentrationen einzustellen wäre mit erheblicher Ungenauigkeit behaftet, sodass verzichtet wurde eine exakte Hemmgrenzkonzentration des p-Hydroxymercuribenzoats zu eruieren. Die Strichelung entspricht einem möglichen Kurvenverlauf.

C.IX. ^{32}P-Sojabohnenlysolecithin- und ^{32}P-Sojabohnenlecithin-Alterung; Alterung der Humanphospholipase B und der Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase (LCAT, Glomset-Enzym)

Mischserum, dem das Bakteriozidicum Cialit im Überschuss (1:1 000) zugesetzt worden war, wurde zum Teil mit ^{32}P-Sojabohnenlysolecithin, zum Teil mit ^{32}P-Sojabohnenlecithin vermengt. Hieraus wurde jeweils 1 ml in Inkubationsröhrchen pipettiert und diese wurden verschlossen ins Kältelabor zu 4° gestellt. Nach verschiedenen Zeiten wurden Ansätze aus dem Kältelabor genommen und teils in der Tiefkühltruhe bei - 15° eingefroren, teils im Schüttler bei 37° inkubiert. Alle Inkubationsansätze wurden gleichlang im Warmwasserbad gehalten und nach Beendigung der Inkubation sofort in der Tiefkühltruhe eingefroren. Nachdem die Ansätze aus dem Kältelabor aufgebraucht waren, wurden sie gemeinsam extrahiert und im Liquid-Scintillation-Counter die ^{32}P-Sojabohnenlysolecithin- und ^{32}P-Sojabohnenlecithinabnahme bestimmt.
Abbildung 11 zeigt die Substratalterung (Spontanzerfall von ^{32}P-Sojabohnenlysolecithin und ^{32}P-Sojabohnenlecithin) und Enzymalterung (spontaner Enzymaktivitätsverlust der Humanphospho-

lipase B und Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase).

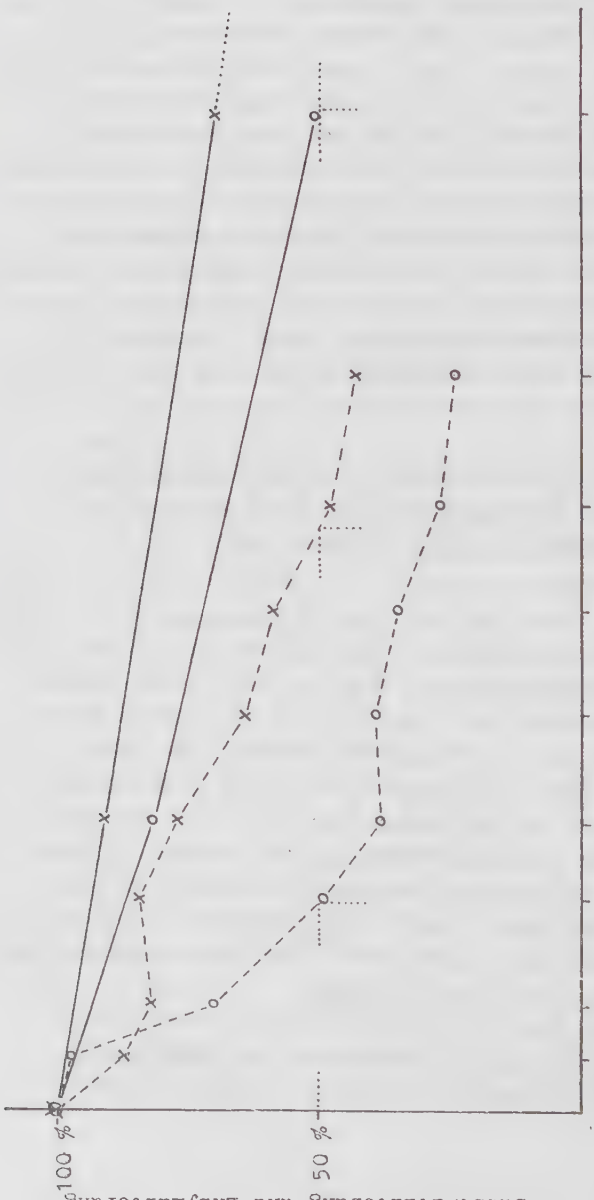


Abbildung 11: ^{32}P-Sojabohnenlysolecithin- und ^{32}P-Sojabohnenlecithin-Alterung, Lysolecithinase-Alterung und Alterung der Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase.

—x——x— : ^{32}P-Sojabohnenlysolecithin; ---x-----x--- : Phospholipase B;

—o——o— : ^{32}P-Sojabohnenlecithin; ---o-----o--- : Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase;

Ordinate: ^{32}P-Sojabohnenlysolecithin- oder ^{32}P-Sojabohnenlecithin-Menge/Ansatz in % des am Tage 0 eingesetzten ^{32}P-Sojabohnenlysolecithins bzw. ^{32}P-Sojabohnenlecithins (Substratalterung).
Restierende Enzymaktivität der Phospholipase B und Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase des Humanserums in % der Aktivität am Tage der Blutentnahme (Enzymalterung).
Abszisse: Zeit (Tage): Tag der Blutentnahme = 0. Tag.
Ergebnis: ^{32}P-Sojabohnenlysolecithin und ^{32}P-Sojabohnenlecithin unterliegen im Humanserum bei 4° und bei zusätzlicher Ausschaltung einer Mikroorganismenwirkung durch Überschuss an dem Bakteriozidicum Cialit einem spontanen Zerfall, der für ^{32}P-Sojabohnenlecithin stärker ist als für ^{32}P-Sojabohnenlysolecithin: nach 38 Tagen ist die Hälfte des eingesetzten ^{32}P-Sojabohnenlecithins zerfallen, während bei ^{32}P-Sojabohnenlysolecithin hierzu ca. 64 Tage nötig sind (Substratalterung).
Die ^{32}P-Sojabohnenlysolecithin hydrolysierende Phospholipase B (Lysolecithinase) des Humanserums zeigt einen zunehmenden Aktivitätsverlust, je länger sie im Kältelabor bei 4° aufbewahrt wird: nach 23 Tagen ist noch 50 % der Ausgangsaktivität vorhanden (Enzymalterung der Humanphospholipase B: Halbwertszeit 23 Tage).
Die ^{32}P-Sojabohnenlecithin abbauende Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase (LCAT, Glomset-Enzym) des Humanserums zeigt bei gleichen Bedingungen einen rascheren Aktivitätsschwund als die Lysolecithinase: bereits 8 Tage nach der Blutentnahme ist nur noch 50 % der ursprünglichen Enzymaktivität vorhanden (Enzymalterung der Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase: Halbwertszeit 8 Tage).

C.X. Die Wechselwirkung zwischen Proteinen des Humanserums und ^{32}P-markierten Sojabohnenphosphatiden (^{32}P-Sojabohnenlecithin, ^{32}P-Sojabohnenlysolecithin)

Proteine des Humanserums (Lipoproteine, Albumin) können Phosphatide (Lecithin, Lysolecithin) binden. Mittels Immunelektrophorese und Autoradiographie (Autoradioimmunelektrophorese) wurde die Wechselwirkung zwischen ^{32}P-Sojabohnenlecithin und ^{32}P-Sojabohnenlysolecithin und Serumproteinen untersucht.

Mischserum wurde zum Teil mit ^{32}P-Sojabohnenlecithin, zum Teil mit ^{32}P-Sojabohnenlysolecithin präinkubiert (Aufbewahren bei Zimmertemperatur für 2 Tage und wiederholtes Umschütteln). Anschliessend wurde das Serum mit dem ^{32}P-Sojabohnenphosphatiden durch Immunelektrophorese aufgetrennt. Nicht präzipitierte Proteine wurden durch langes Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung (pH 7,4) und wiederholte Erneuerung der Lösung aus der Agarose entfernt. Nach dem Trocknen wurde die Immunelektrophorese mit einem Röntgenfilm für 5 Wochen in möglichst engen Kontakt zur Erstellung einer Autoradiographie gebracht.
Abbildung 12 zeigt die Immunelektrophorese und die entsprechende Autoradiographie von Mischserum, das teils mit ^{32}P-Sojabohnenlecithi teils mit ^{32}P-Sojabohnenlysolecithin präinkubiert wurde.

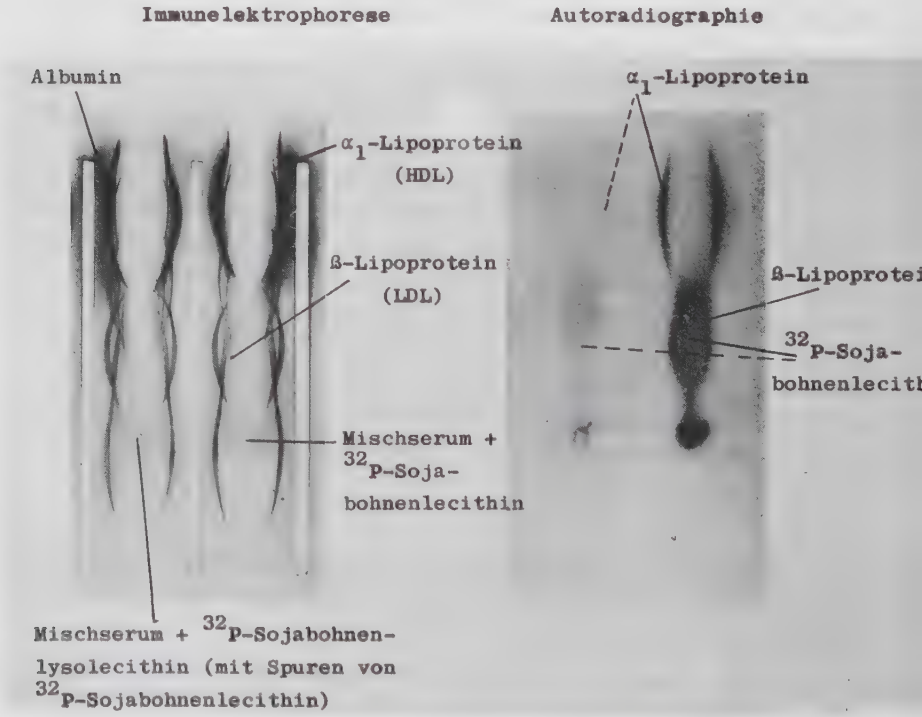


Abbildung 12: Immunelektrophorese und Autoradiographie von mit ^{32}P-Sojabohnenlecithin und ^{32}P-Sojabohnenlysolecithin präinkubiertem Humanserum.

Mischserum: Verdünnung mit in physiologischer Kochsalzlösung gelöstem ^{32}P-Sojabohnenlecithin bzw. ^{32}P-Sojabohnenlysolecithin 1 : 1; 5 µl.
HDL = High-Density-Lipoproteine, α_1-Lipoproteine.
LDL = Low-Density-Lipoproteine, ß-Lipoproteine.
Elektrophorese für 2 Stunden bei 100 Volt.
200 µl Antihumanserum vom Kaninchen.
Röntgenfilm: Agfa-Gevaert, Osray DW: 5 Wochen Expositionszeit.

Ergebnis: ^{32}P-Sojabohnenlecithin wandert immunelektrophoretisch mit den ß-Lipoproteinen (Low-Density-Lipoproteine, LDL) und den α_1-Lipoproteinen (High-Density-Lipoproteine, HDL). Die Bindung des ^{32}P-Sojabohnenlecithins an die HDL und LDL ist jedoch verschieden. ^{32}P-Sojabohnenlecithin ist in das Molekül des HDL voll integriert: physiologische Kochsalzlösung (pH 7,4) wäscht das fettlösliche ^{32}P-Sojabohnenlecithin im Verband der HDL gänzlich aus dem nicht präzipitierten Bereich der Agarose aus; das immunpräzipitierte HDL lässt das eingelagerte ^{32}P-Sojabohnenlecithin in der Autoradiographie als α_1-Lipoprotein-Linie erkennen.
Das ^{32}P-Sojabohnenlecithin wird an die LDL hingegen nur locker gebunden. Physiologische Kochsalzlösung wäscht aus der Agarose die LDL aus, während das fettlösliche ^{32}P-Sojabohnenlecithin in der Agarose zurückbleibt: der Proteinnachweis durch Amidoschwarzfärbung der Immunelektrophorese ist im Bereich der nicht präzipitierten ß-Lipoproteine negativ, der Nachweis von ^{32}P-Sojabohnenlecithin durch Autoradiographie im gleichen Bereich positiv. Neben der Fleckenschwärzung zeigt die Autoradiographie eine klare Linienschwärzung, die sich mit der ß-Lipoprotein-Immunpräzipitationslinie der Immunelektrophorese zur Deckung bringen lässt.
Bei den HDL (α_1-Lipoproteine) ist also ^{32}P-Sojabohnenlecithin fest und stabil im Phosphatidanteil eingelagert, während die LDL (ß-Lipoproteine) ^{32}P-Sojabohnenlecithin nur locker und leicht abspaltbar binden.
Lysolecithin wird unter Komplexbildung dem Albumin angelagert (95,96). Obwohl die Immunelektrophorese eine starke Albuminbande zeigt, findet sich in der Autoradiographie keine

entsprechende Linienschwärzung. Physiologische Kochsalzlösung löst das wasserlösliche ^{32}P-Sojabohnenlysolecithin aus dem Humanalbumin-Antihumanalbumin-^{32}P-Sojabohnenlysolecithin-Verband heraus : Lysolecithin wird vom Albumin unter Bildung des Albumin-Lysolecithin-Komplexes nur locker und leicht trennbar gebunden. Die geringe Fleckenschwärzung im Bereich der ß-Lipoproteine und die minimale Linienschwärzung im Bereich der α_1-Lipoproteine rührt von der ^{32}P-Sojabohnenlecithinverunreinigung des dem Mischserum zugesetzten ^{32}P-Sojabohnenlysolecithins her (Methode B.VIII.).

C.XI. Substratcharakterisierung durch Bestimmung des Sättigungsgrades der im Lysolecithin veresterten Fettsäure

Das Substrat "synthetisches Lysolecithin" besitzt als einzige Variable im Molekül eine veresterte Fettsäure. Im folgenden wird mit einer neuen Methode aufgezeigt, dass es sich hierbei um eine gesättigte Fettsäure handelt.

Prinzip: Die zu untersuchende Substanz "synthetisches Lysolecithin" wird mit der einfach ungesättigten Monocarbonsäure "Ölsäure" bezüglich der Fähigkeit der Jodanlagerung spektralphotometrisch verglichen.

Zwei Tropfen (Pasteur-Pipetten) Ölsäure rein (cis-Δ^9-Octadecensäure, Molekulargewicht 282,47) werden exakt als 25,64 mg gewogen und mit 15 ml einer Jod-bidest. Wasser-Lösung versetzt.

Eine äquivalente Menge Lysolecithin (Molekulargewicht 519,71), die sich zu 47,17 mg errechnet (Lysolecithin in mg = Ölsäure in mg x 1,84; Faktor 1,84 = Molekulargewicht Lysolecithin / Molekulargewicht Ölsäure, da das Molekulargewicht der Ölsäure etwa dem mittleren Molekulargewicht der Fettsäure des Lysolecithins entspricht) wird mit 15 ml einer Jod-Diäthyläther-Lösung versetzt. Es werden Schliffröhrchen verwendet, die nach Zugabe der Jodlösungen mit einem Glasstopfen sofort verschlossen werden. Nach intensivem Mischen und Ultrabeschallung werden die verschlossenen Röhrchen für 10 Minuten bei 1800 x g zentrifugiert, wobei sich das Lysolecithin am Boden absetzt und im Vergleichsansatz die Ölsäure an der Oberfläche verbleibt. Während nach dem Abzentrifugieren des Lysolecithins der Überstand durch einen Faltenfilter in

Quarzküvetten dekantiert werden kann, muss bei den Ansätzen mit Ölsäure diese erst mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt werden und die Jod-Wasser-Lösung dann vorsichtig, ohne die Glaswand zu berühren, in die Küvette pipettiert werden. Mit dem Beckman-DB-Spectrophotometer und Servogor-RE-514-Kompensationsschreiber wird die Spektralkurve der Jod-Diäthyläther-Lösung ohne uhd nach Lysolecithinexposition gegen Diäthyläther registriert, sowie jene der Jod-Wasser-Lösung ohne und nach Ölsäurebehandlung gegen bidest. Wasser.
Abbildung 13: Spektrale Absorptionskurven von Jodlösungen, die mit Lysolecithin und Ölsäure behandelt wurden.

Abszisse: Wellenlänge in nm.
Ordinate: Spektrale Absorption in Absorptionsgraden.
A: Jod-Diäthyläther-Lösung gegen Diäthyläther.
B: Jod-Diäthyläther-Lösung gegen Diäthyläther nach Lysolecithin-Exposition.
C: Jod-bidest. Wasser-Lösung gegen bidest. Wasser.
D: Jod-bidest. Wasser-Lösung gegen bidest. Wasser nach Ölsäure-Exposition.
Scan-Speed: fast (= 40 nm/min).
Papiergeschwindigkeit: 30 nm/min.

Abbildung 13: Seite 53

Ergebnis: Die Jod-Diäthyläther- und Jod-Wasser-Absorptionskurven zeigen gemeinsame Maxima zwischen 453 nm und 467 nm. In diesem Wellenlängenbereich können Aussagen über Jodkonzentrationsänderungen der entsprechenden Lösungen, bedingt durch Einlagerung von Jod in vorhandene ungesättigte Bindungen, getroffen werden. Während Lysolecithin nur eine äusserst geringe Menge Jod aus der Jod-Diäthyläther-Lösung entfernte (Differenz A - B bei 453 nm-467 nm: 1,5 %), findet man hingegen eine beträchtliche Verminderung der Jodkonzentration in der Jod-Wasser-Lösung nach Ölsäurebehandlung (Differenz C - D bei 453 nm-467 nm: 64,4 %). Bei Berücksichtigung der Reinheit der Substanzen und der Fehlerbreite der Methode handelt es sich also um ein Lysolecithin,

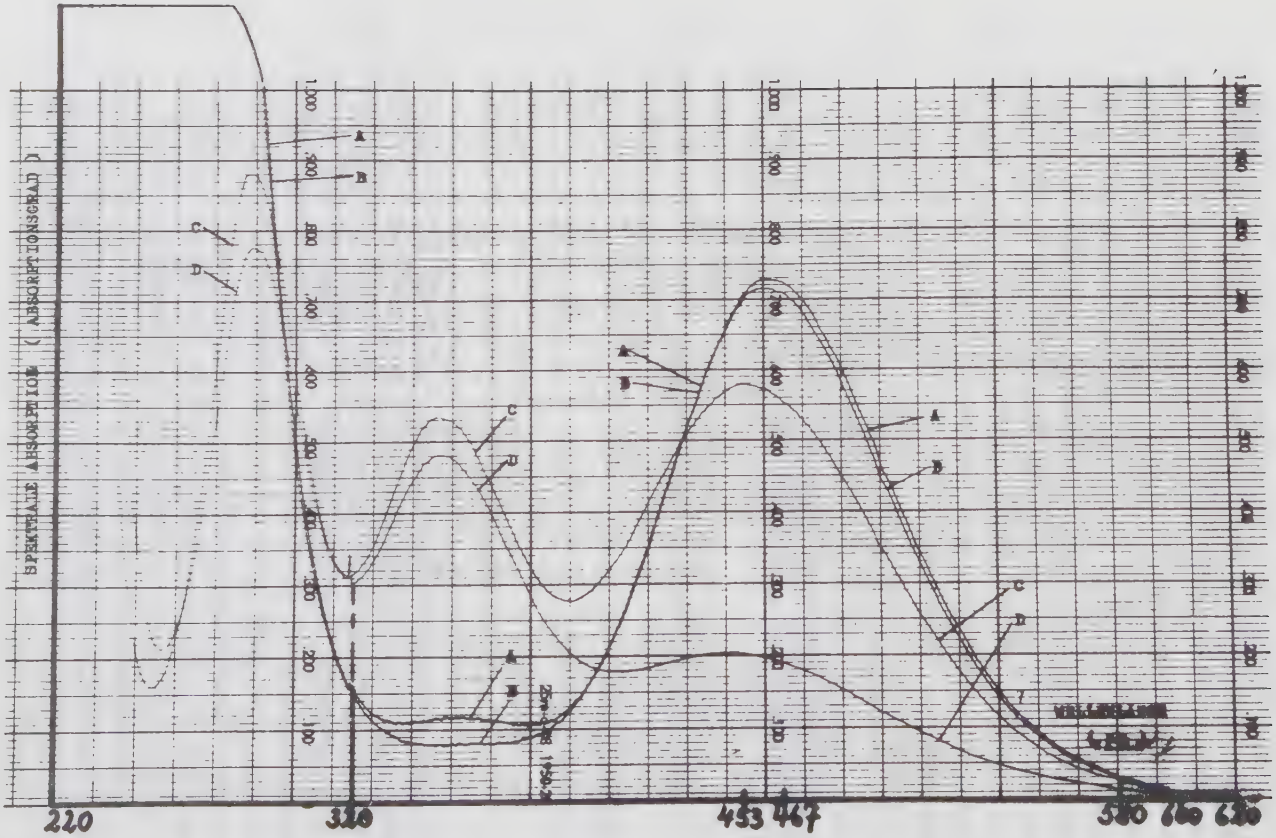


Abbildung 13

dass eine gesättigte Fettsäure enthält.

Dünnschichtchromatographische Reinheitsprüfung von "Ölsäure rein" und "synthetischem Lysolecithin":

Mittels einer Zweistufen-Dünnschichtchromatographie wurden Lysolecithin und Ölsäure auf ungesättigte Begleitsubstanzen untersucht.
Ölsäure und Lysolecithin wurden in Chloroform dest. : Methanol dest. = 65 ml : 25 ml gelöst und auf eine Kieselgel-DC-Platte aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte mit zwei Laufmitteln.

1. Laufmittel:

Chloroform dest. : Methanol dest. : bidest. Wasser = 56 ml : 24 ml : : 4 ml.

Kammersättigung: 3 - 4 Stunden.
Laufhöhe: 12 cm.
1/2 Stunde an der Luft trocknen.

2. Laufmittel:

n-Hexan : Diäthyläther : Eisessig = 85 ml : 20 ml : 1,2 ml.
Kammersättigung: 20 - 30 Minuten.
Laufhöhe: 18 cm.

Ergebnis: Während beim Anfärben der Dünnschichtplatten mit Jod die Ölsäure als eine Bande imponiert, findet man im "synthetischen Lysolecithin" geringe Verunreinigungen: Sphingomyelin, Lecithin, freie Fettsäuren, Cholesterinester. Doppelbindungen in diesen Fettsäureverbindungen dürften wohl für die geringe Jodanlagerung des synthetischen Lysolecithins verantwortlich gemacht werden.

D. Anreicherung der Phospholipase B (Lysolecithinase) des Humanserums

Die Versuche zur Anreicherung der Phospholipase B (Lysolecithinase) des Humanserums wurden bei 4° durchgeführt.

D.I. Nachweis der enzymatischen Aktivität (Lysolecithinase-aktivität) in den mittels Ammoniumsulfatfällung von Mischserum gewonnenen Fraktionen N_1, N_2 und N_3

Zur Anreicherung des Enzyms wurde Mischserum mit Ammoniumsulfat fraktioniert (Methode B.XVIII.). Aus den erhaltenen Fraktionen N_1, N_2 und N_3 wurden Ansätze zur Inkubation und zur Kontrolle hergestellt, aus denen nach Extraktion (Methode B.V.) und dünnschichtchromatographischer Lipidauftrennung (Methode B.VI.) die Phospholipide mittels Phosphorbestimmung nach Fiske-Subbarow (Methode B.VII.) bestimmt wurden. In Abbildung 14 sind die Phospholipidkonzentrationen von N_1, N_2 und N_3 und ihre quantitativen Veränderungen durch Inkubation bei 37° für 22 Stunden aufgeführt.

Abbildung 14: Lecithinabnahme, Lysolecithinzunahme und Lysolecithinabbau in den Ammoniumsulfatfraktionen N_1, N_2 und N_3.

L = Lecithin

LL = Lysolecithin

ΔL = Lecithinabnahme

ΔLL = Lysolecithinabnahme

N_1, N_2, N_3 = Ammoniumsulfatfällungen

Ergebnis: Die Ammoniumsulfatfraktion N_3 (Proteine, die mit mehr als 55 %iger Ammoniumsulfatsättigung zu fällen sind) zeigt keine Phospholipase B-Aktivität. Die in N_3 vorhandene Phospholipase A baut Lecithin zu Lysolecithin ab: durch das Fehlen der Lysolecithinase entspricht die Lysolecithinzunahme dem Lecithinabbau.

Lysolecithinaseaktivität ist fast nur in der Fraktion N_2 (Ammoniumsulfatsättigung zwischen 28 % = 1,12 M und 55 % = 2,2 M) nachweisbar. Durch die Lecithinase kommt es zum Abbau von Lecithin zu Lysolecithin (Lysolecithin aus Lecithin), welches das im Mischserum physiologischerweise vorhandene Lysolecithin (Lysolecithin a priori) vermehrt. Dieses gesamte Lysolecithin steht der Phospholipase B (Lysolecithinase) als Substrat zur Verfügung. - Durch die Ammoniumsulfataussalzung gelang eine Anreicherung des Enzyms in der Fraktion N_2 um den Faktor 2,8 gegenüber Mischserum. N_2 wird deshalb für die weiteren Versuche zur Anreicherung der Lysolecithinase benützt.

Um zu prüfen, ob in der Fraktion N_1 bei vorhandener Enzymaktivität lediglich das Substrat fehlt oder zumindest nicht in ausreichender Menge vorhanden ist, wurde dieser Fraktion bei einer Wiederholung des Versuchs als Substrat synthetisches Lysolecithin zugesetzt.

Versuch: Der Ammoniumsulfatfällung N_1 (28 %ige Ammoniumsulfatsättigung) wurde synthetisches Lysolecithin zugesetzt und aus den Kontrollansätzen (4^{o}) und Inkubationsansätzen (37^{o}) die enzymatische Aktivität ermittelt.

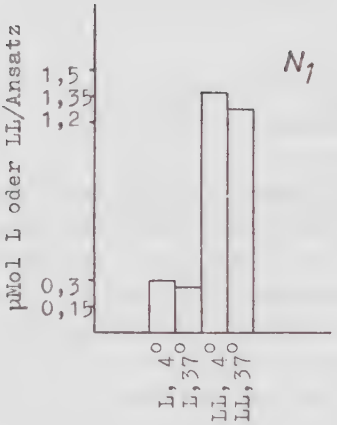


Abbildung 15 zeigt die Lecithinabnahme und die Lysolecithinabnahme nach Inkubation von N_1 mit synthetischem Lysolecithin.

L = Lecithin

LL = Lysolecithin

N_1 = Ammoniumsulfatfällung

Ergebnis: Die Fraktion N_1 ist enzymatisch inaktiv. Die geringe Lysolecithinaseaktivität kann unter Berücksichtigung der Fehlerbreite der Methode vernachlässigt werden.

D.II. Phospholipase B-Aktivität in den mittels Ultrazentrifugation von N_2 gewonnenen Fraktionen ZZ und U

Die Ammoniumsulfatfällung N_2 wurde nach Salzaustauschchromatographie (Methode B.XIV.) mit Kaliumbromid auf die Dichte D = 1,210 g/ml eingestellt und ultrazentrifugiert (Methode B.XIX.). Der Inhalt der Zentrifugenröhrchen wurde von oben nach unten in folgende Fraktionen unterteilt:

0,5 ml GLP (= Gesamtlipoproteine)

6 ml ZZ (= Zwischenzone)

5,5 ml U (= Unterstand).

Die sich entsprechenden Fraktionen mehrerer Röhrchen wurden

gesammelt, wenn nötig eingeengt, und anschliessend gegen Kochsalz-EDTA-Lösung (pH 7,4) dialysiert. Aus der Zwischenzone ZZ und dem Unterstand U wurden Inkubationsansätze und Kontrollansätze hergestellt, die synthetisches Lysolecithin als Substrat enthielten. Der Lysolecithinabbau durch U und ZZ ist in Abbildung 16 aufgeführt.

Abbildung 16: Lysolecithinabbau in den Fraktionen U und ZZ.

LL = Lysolecithin
L = Lecithin
ΔLL = Lysolecithinabnahme
U = Unterstand
ZZ = Zwischenzone

Ergebnis: Während in der durch Ultrazentrifugation der Ammoniumsulfatfällung N_2 erhaltenen Fraktion U hohe Lysolecithinaseaktivität gefunden wird, ist eine enzymatische Aktivität in der Fraktion ZZ kaum zu finden. Durch die Ultra-

zentrifugation von N_2 gelang eine Anreicherung des Enzyms bezüglich Mischserum um den Faktor 3,3.
Die geringen Mengen Lecithin in den Ansätzen stammen zum Teil aus den Flotationsprodukten U und ZZ, zum Teil aus dem nicht reinen synthetischen Lysolecithin, das in geringen Mengen Lecithin, Neutralfette und Fettsäuren enthält. Diese geringen Lecithinmengen lassen keine schlüssige Aussage über Lecithinase-aktivitäten in U und ZZ bei Berücksichtigung der Fehlerbreite der Methode zu.
Für die weitere Anreicherung des Lysolecithin abbauenden Enzyms des menschlichen Serums wird der durch Ultrazentrifugation von N_2 erhaltene Unterstand U verwendet.

D.III. Auftrennung der Fraktion U durch Gelfiltration an Sephadex-G-200-superfine

Die enzymhaltige Fraktion U wurde auf Sephadex-G-200-superfine aufgetrennt (Methode B.XX.). Die erhaltenen Fraktionen F_1, F_2 und F_3 wurden eingeengt und bei 4^o gegen physiologische Kochsalzlösung, die einen 0,1 %igen Zusatz von EDTA enthielt, dialysiert. Von diesen Fraktionen wurden Kontrollansätze und Inkubationsansätze mit synthetischem Lysolecithin hergestellt und die Kontrollansätze bei 4^o im Kältelabor gehalten, während die Inkubationsansätze bei 37^o im Schüttelinkubator für 22 Stunden standen.
In Abbildung 17 sind die Auftrennung von U auf Sephadex-G-200-superfine und die Enzymaktivitäten der einzelnen Fraktionen aufgezeichnet.

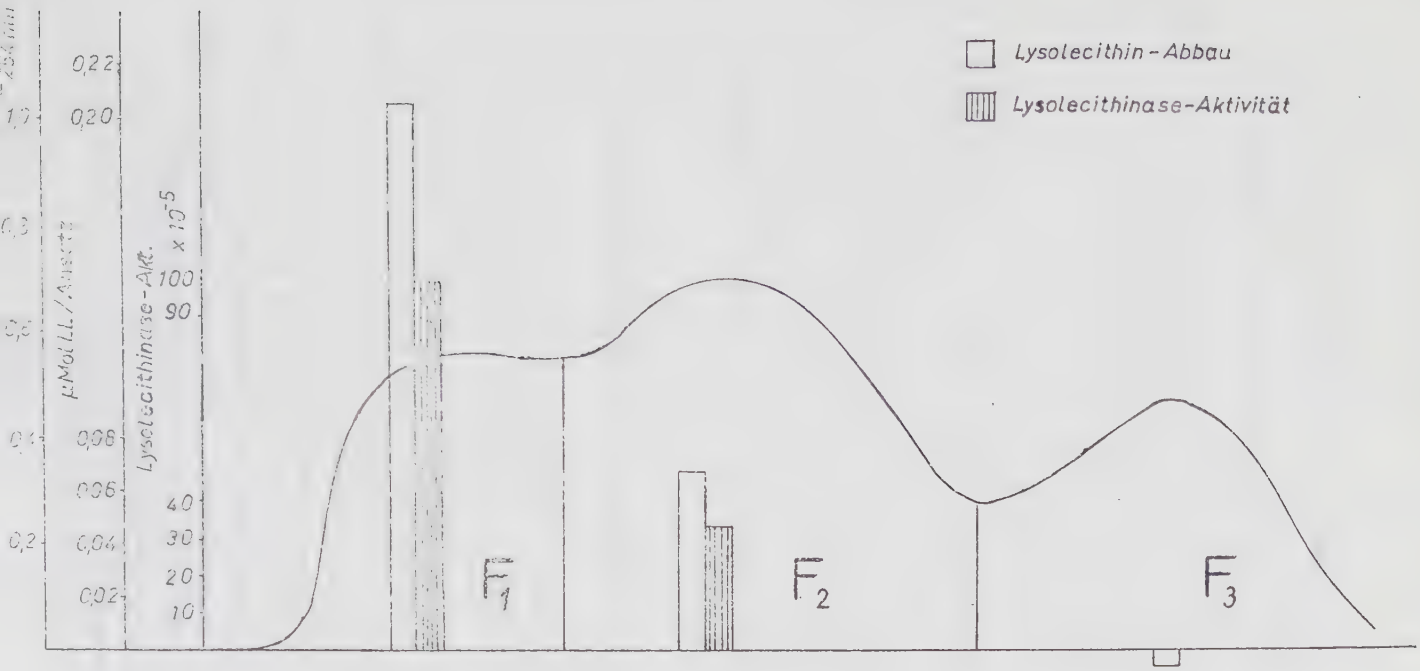


Abbildung 17: Extinktionskurve bei Auftrennung von U auf Sephadex-G-200-superfine, Lysolecithinabbau und Lysolecithinaseaktivität in den Fraktionen F_1, F_2 und F_3.

$E_{254\ nm}$ = Extinktion bei der Wellenlänge 254 nm.
LL = Lysolecithin
F_1, F_2, F_3 = Fraktionen nach Auftrennung von U auf Sephadex-G-200-superfine

Lysolecithinaseaktivität: µMol LL/mg Protein/Stunde bei 37° und pH 7,4.
Säulendimensionen: Länge 90 cm, Durchmesser 2,5 cm.
Aufgetragene Substanzmenge: 3 ml U mit 388,8 mg Protein.
Puffer: 0,02 M Phosphatpuffer (pH 7,4)
Arbeitsdruck: 15 cm Wassersäule
Ausflussvolumen: 3,5 ml/Stunde

Ergebnis: Der Hauptteil der Lysolecithinaseaktivität befindet sich in der Fraktion F_1. In dieser Fraktion ist das Enzym auf das 11,9-fache des Mischserums angereichert. Während in der Fraktion F_3 keinerlei enzymatische Aktivität gefunden wird, streut das Enzym in geringem Masse von der Fraktion F_1 nach F_2. Da eine Anreicherung des Enzyms mittels Gelfiltration an Sephadex-G-200-superfine nicht in befriedigendem Ausmasse stattfindet, wurden weitere Versuche mit Ionenaustauschchromatographie durchgeführt.

D.IV. Auftrennung der Fraktion U auf dem Anionenaustauscher DEAE-Sephadex-A-50

Die enzymhaltige Fraktion U wurde durch Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephadex-A-50 (Methode B.XXI.) aufgetrennt in die Fraktionen G_1 bis G_6. Die Fraktion G_1 wurde gewonnen durch Abwaschen der Säule mit Startpuffer und enthält somit alle nicht an den Anionenaustauscher adsorbierten Proteine, während die Fraktionen G_2 bis G_6 nach Anlegen eines kontinuierlich-linearen Phosphatpuffergradienten steigender Molarität erhalten wurden. Die einzelnen Fraktionen wurden eingeengt und dialysiert bei 4° gegen eine Kochsalz-EDTA-Lösung (0,9 % NaCl + 0,1 % EDTA; pH 7,4). Anschliessend wurden die Fraktionen mit synthetischem Lysolecithin auf Enzymaktivität ausgetestet. Zur Darstellung der kontinuierlichen Veränderung der Ionenzusammensetzung des Elutionsmittels nach dem Gradientenprinzip, wurde bei jedem vierten Ausflussröhrchen - als Ausdruck für die zunehmende Ionenstärke - die Osmolarität gemessen.

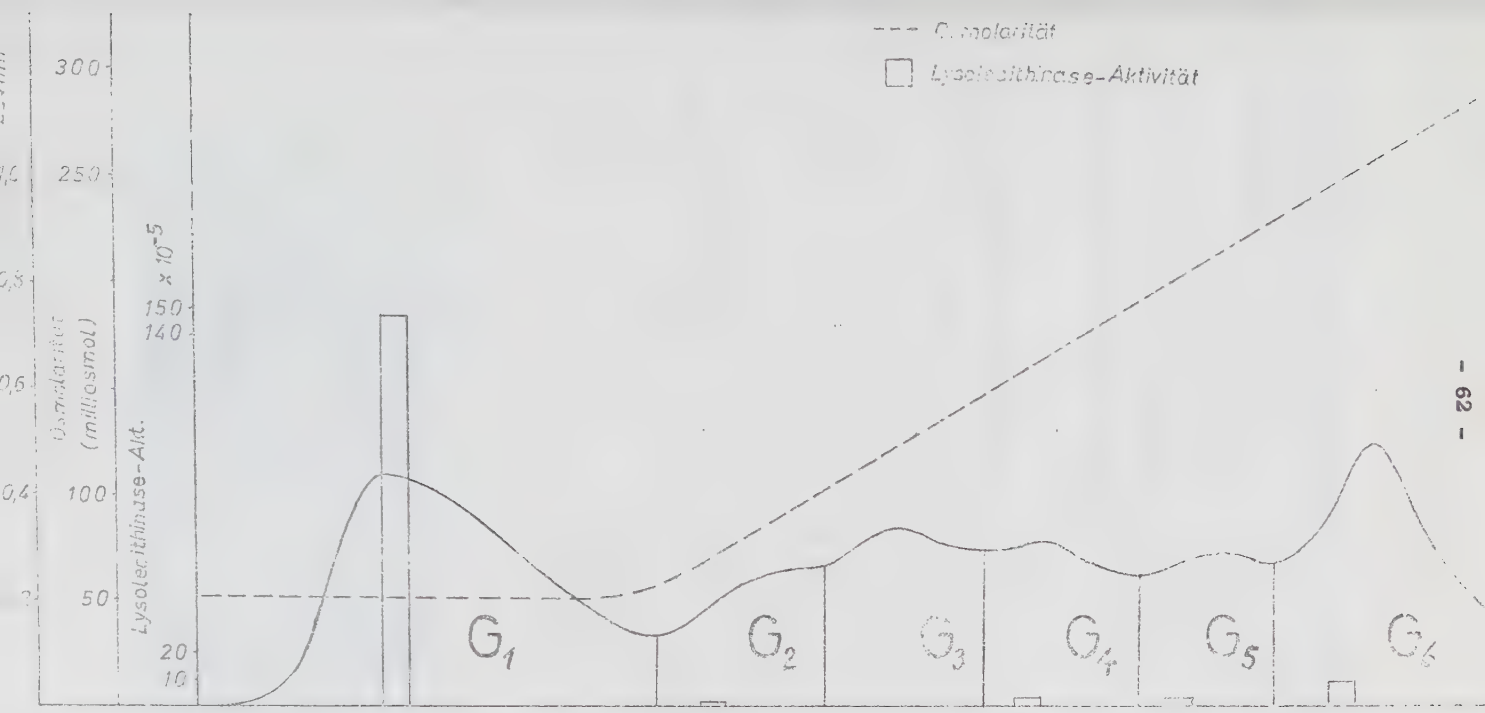


Abbildung 18 zeigt die Extinktionskurve bei Auftrennung von U durch Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephadex-A-50, die Änderung der Osmolarität in den Ausflussröhrchen nach Anlegen des Gradienten, sowie die Enzymaktivitäten in den Fraktionen G_1 bis G_6.

$E_{254\ nm}$ = Extinktion bei der Wellenlänge 254 nm.
G_1 - G_6: Fraktionen nach Auftrennung von U auf DEAE-Sephadex-A-50.
Lysolecithinaseaktivität: µMol LL/mg Protein/Stunde bei 37° und pH 7,4
Säulendimensionen: Länge 37 cm, Durchmesser 2,5 cm.
Aufgetragene Substanzmenge: 15 ml U mit 2160 mg Protein.
700 ml Startpuffer: 0,02 M Phosphatpuffer (pH 7,4; Osmolarität: 50 milliosmol)
1 Liter Grenzpuffer: 0,2 M Phosphatpuffer (pH 7,4; Osmolarität: 400 milliosmol)
Ausflussvolumen: 23 ml/Stunde.

Ergebnis: Lysolecithinaseaktivität ist fast nur in der Fraktion G_1 zu finden, die noch vor Anlegen des Gradienten mit Ausgangspuffer (0,02 M Phosphatpuffer) eluiert wurde, wie an der gleichbleibenden Osmolarität des Eluats zu ersehen ist. In G_1 ist das Enzym um den Faktor 17,8 gegenüber Mischserum angereichert. Die Enzymaktivitäten in den übrigen Fraktionen sind im Vergleich zu G_1 zu vernachlässigen.
Die Proteine der enzymatisch aktiven FraktioneG_1 waren nicht an den Anionenaustauscher adsorbiert. Nur Kationen, neutrale Proteine und Anionen mit einer Ionenstärke unter der des 0,02 M Phosphatpuffers, werden nicht an das Gel gebunden und erscheinen mit dem Startpuffer im Eluat. Dies soll mit einer Elektrophorese (Methode B.XVI.) der G_1-Proteine im Vergleich zu Mischserum verifiziert werden:

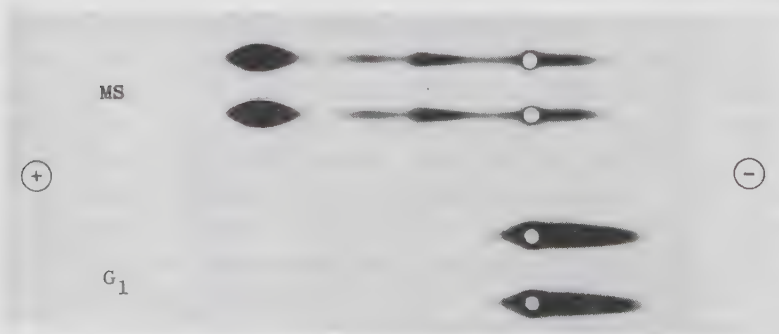


Abbildung 19: Elektrophorese des Mischserums und der enzymatisch aktiven Fraktion G_1.

MS = Mischserum: Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung 1:1; 5 µl.

G_1 = enzymatisch aktive Fraktion: 5 µl.

Die Elektrophorese zeigt, dass sich in der Fraktion G_1 vor allem Kationen und neutrale Proteine befinden.

D.V. Kationenaustauschchromatographie der Fraktion U auf CM-Sephadex-C-50

Die Fraktion U wurde durch den Kationenaustauscher CM-Sephadex-C-50 in die Fraktionen H_1 und H_2 aufgetrennt (Methode B.XXII.). Die Fraktion H_1 wurde durch Abwaschen der nicht an das Säulenmaterial adsorbierten Proteine mit Ausgangspuffer (0,02 M Phosphatpuffer) eluiert. Sie enthält die unter den gegebenen Bedingungen als Anionen, neutrale Proteine und Kationen mit niedrigerer Ionenstärke als 0,02 M Phosphatpuffer vorliegenden Eiweisse. Erst durch ca. 20-stündiges Abwaschen gelang es den Grossteil der nicht adsorbierten Proteine zu eluieren. Anschliessend wurde ein linearer Phosphatpuffergradient steigender Molarität angelegt, der jedoch nur die Fraktion H_2 lieferte. Als Ausdruck für die Veränderung der Ionenstärke im Elutionsmittel in Form eines kontinuierlich-linearen Gradienten wurde bei jedem vierten Ausflussröhrchen die Osmolarität bestimmt. H_1 und H_2 wurden eingeengt, dialysiert gegen physiologische Kochsalzlösung (pH 7,4) und mit synthetischem Lysolecithin auf Lysolecithinaseaktivität ausgetestet.
Abbildung 20 zeigt die Extinktionskurve bei Auftrennung von U auf dem Kationenaustauscher CM-Sephadex-C-50, die Zunahme der Osmolarität in den Ausflussröhrchen nach Anlegen des Gradienten, sowie die Enzymaktivitäten in den Fraktionen H_1 und H_2.

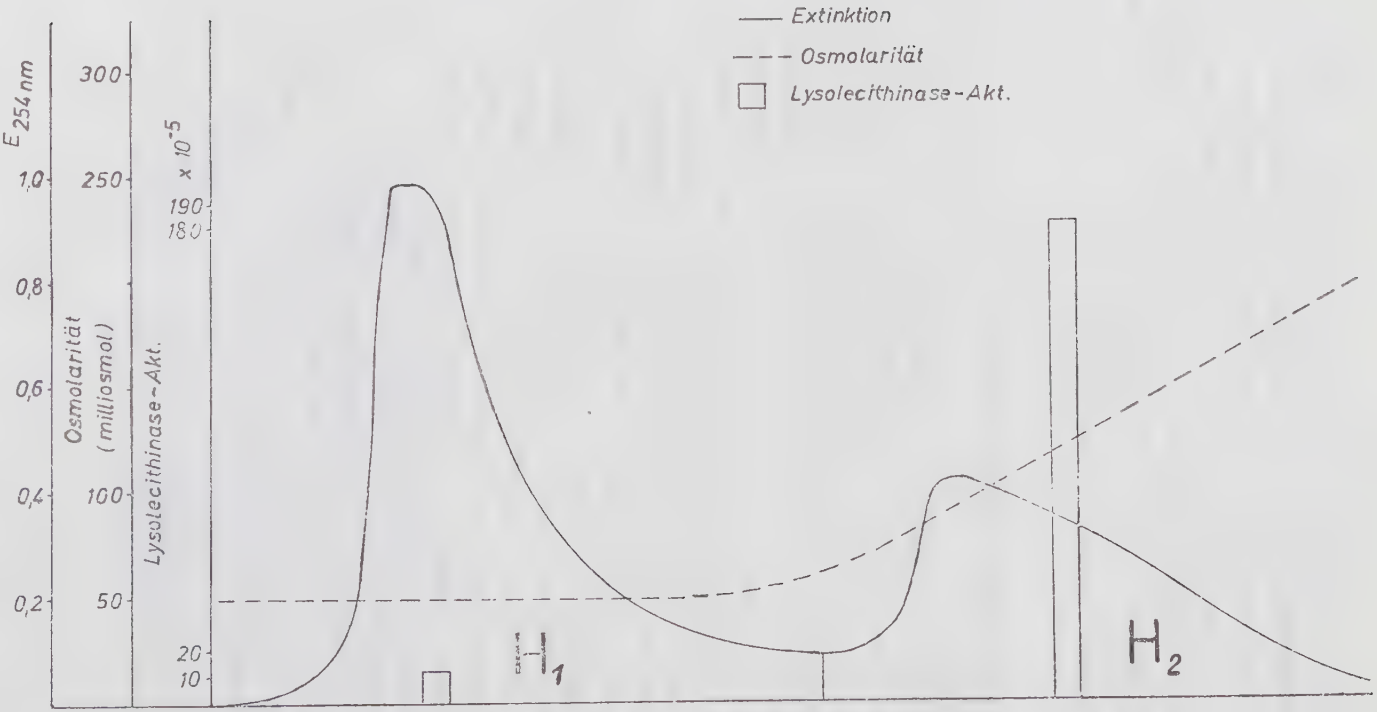


Abbildung 20: Auftrennung von U auf dem Kationenaustauscher CM-Sephadex-C-50.

$E_{254\ nm}$ = Extinktion bei der Wellenlänge 254 nm.
H_1, H_2: Fraktionen nach Auftrennung von U auf CM-Sephadex-C-50.
Lysolecithinaseaktivität: µMol LL/mg Protein/Stunde bei 37° und pH 7,4.
Säulendimensionen: Länge 39 cm, Durchmesser 2,5 cm.
Aufgetragene Substanzmenge: 7 ml U mit 1075 mg Protein.
700 ml Startpuffer: 0,02 M Phosphatpuffer (pH 7,4; Osmolarität: 50 milliosmol)
1 Liter Grenzpuffer: 0,2 M Phosphatpuffer (pH 7,4; Osmolarität: 400 milliosmol)
Ausflussvolumen: 20 ml/Stunde.

Ergebnis: Das Enzym ist in der Fraktion H_2 auf das 21,9-fache des Mischserums angereichert. Der geringe Lysolecithinabbau in H_1 ist bei Berücksichtigung der Spontanhydrolyse und der Fehlerbreite der Methode zu vernachlässigen. Die enzymatisch aktive Fraktion H_2 wurde erst nach Anlegen des linearen Phosphatpuffergradienten an den Kationenaustauscher eluiert und kann somit nur Kationen enthalten. Mit einer Elektrophorese von H_2 soll dies belegt werden:

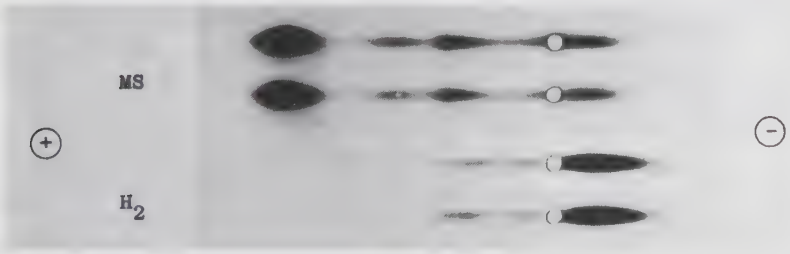


Abbildung 21: Elektrophorese der enzymatisch aktiven Fraktion H_2 im Vergleich zu Mischserum.

MS = Mischserum: Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung 1:1; 5 µl.
H_2 = enzymatisch aktive Fraktion; 5 µl.

Die Elektrophorese zeigt, dass die enzymatisch aktive Fraktion H_2 vor allem Kationen enthält. Daneben sind jedoch auch Anionen zu finden, die durch unvollständiges Abwaschen der Säule mit Ausgangs-

puffer vor Anlegen des Gradienten noch auf der Säule verblieben waren. Bei einer Wiederholung des Versuches wurde nicht nur 20 Stunden, sondern doppelt solange durchgespült, was jedoch auch nicht zu einer kompletten Entfernung der nicht adsorbierten Moleküle führte. Das Enzym konnte dadurch als Kation charakterisiert werden.

D.VI.) I. Batch-Operation

Die Trennung der Proteine des Mischserums zur Enzymanreicherung durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung von Mischserum, Ultrazentrifugation bei erhöhter Dichte und Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephadex-A-50, kann durch einen Batch-Prozess vereinfacht werden, in dem der Grossteil der Begleitkomponenten des Enzyms im Humanserum an den Austauscher gebunden wird, während die relevante Substanz in Lösung bleibt (97,98,99). Bei dieser I. Batch-Operation wird direkt aus Mischserum die enzymatisch aktive und angereicherte Fraktion G_1' erhalten.

1. Bereitung des Batchmaterials:

50 g DEAE-Sephadex-A-50 werden langsam in 8 l bidest. Wasser unter Rühren eingegossen und für eine Stunde bei Zimmertemperatur verrührt. Anschliessend lässt man das gequollene Gel für 15 Minuten sich absetzen und saugt das darüberstehende Wasser ab. Es werden erneut 2 Liter bidest. Wasser zur Gelsuspension hinzugegeben und verrührt. Nach dem Absetzen wird wieder abgesaugt um die "fines" zu entfernen. Dieser Vorgang wird noch dreimal wiederholt und im Anschluss die Gelsuspension auf einem mit Filterpapier ausgelegten Büchner-Trichter möglichst trocken gesaugt. Mit 4 Litern 0,5 N Natronlauge wird dann das Gel auf dem Büchner-Trichter gewaschen und mit 4 x 3 Litern bidest. Wasser nachgespült. Der Anionenaustauscher wird mit 4 Litern 0,5 N Salzsäure in die Chlorid-Form übergeführt und erneut mit 4 x 3 Litern bidest. Wasser gespült. Anschliessend wird das Material mit 4 Litern 0,01 M Phosphatpuffer (pH 7,4) gewaschen und mit dem gleichen Puffer äquilibriert. Nach dem Absetzen des Gels wird die Oberphase vollständig abgesaugt und das abgesetzte Gel zur Batch-Operation herangezogen.

2. Batch-Prozess:

200 ml undialysiertes Mischserum wurden mit 1,5 Liter gequollenem Gel (Faktor 7,5 ist für Serum ausreichend zur Verhinderung einer Übersättigung des Anionenaustauschers mit Proteinen) vermischt und im Kältelabor drei Stunden gerührt. Anschliessend wurde das Serum-Gel-Gemisch zehn Minuten bei 1800 x g zentrifugiert und dabei getrennt in Unterstand (Gel mit gebundenen Proteinen, gelb) und in wasserklare Oberphase (Puffer mit jenen Proteinen, welche nicht an DEAE-Sephadex gebunden worden waren). Der Überstand wurde dekantiert, filtriert und durch Ultrafiltration (Methode B.XV.) eingeengt. Der elektrophoretische Nachweis zeigt, dass in der durch die I. Batch-Operation erhaltenen Fraktion G_1' sich im Vergleich zum Aufarbeitungsprozess mittels Ammoniumsulfatfällung von Mischserum, Ultrazentrifugation und Säulenchromatographie, noch geringe Mengen ß-Globuline befinden.

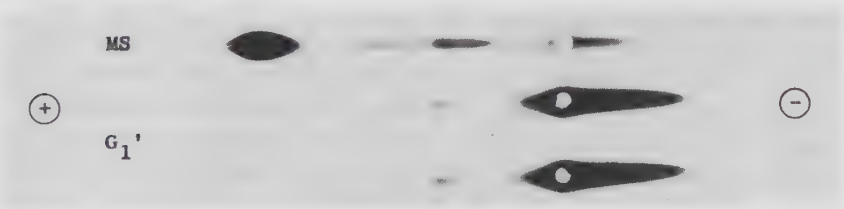


Abbildung 22 zeigt die Elektrophorese der durch die I. Batch-Operation erhaltenen enzymatisch aktiven Fraktion G_1' im Vergleich zu Mischserum. (Vergleiche Abbildung 19!)

MS = Mischserum: Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung 1 : 1; 5 µl.

G_1' = enzymatisch aktive Fraktion (I. Batch-Operation); 5 µl.

3. Regeneration des Gels:

Das benützte und mit Proteinen beladene gelbe DEAE-Sephadex-A-50 wurde in Anlehnung an Peterson et al. (100) regeneriert. Der Anionenaustauscher wurde mit 4 Litern 1,5 M NaCl-Lösung vermischt und auf einem mit Filterpapier belegten Büchner-Trichter abgesaugt. Im weiteren wurde auf dem Büchner-Trichter nach

folgendem Schema gewaschen: 2 Liter 1,5 M NaCl-Lösung, 1 Liter bidest. Wasser, 2 Liter 0,5 N Natronlauge, 5 Liter 95 %iger Äthylalkohol, 8 Liter bidest. Wasser, 2 Liter 0,5 N Salzsäure, 4 Liter bidest. Wasser, 4 Liter 0,01 M Phosphatpuffer. Im Anschluss wurde das regenerierte Gel mit 0,01 M Phosphatpuffer (pH 7,4) äquilibriert und bis zur Wiederverwendung bei 4^{o} gelagert.

D.VII. Auftrennung der mit dem Anionenaustauscher DEAE-Sephadex A-50 gewonnenen Fraktion G_1 durch Kationenaustauschchromatographie auf CM-Sephadex-C-50

Die angereicherte Enzymfraktion G_1 (Siehe D.IV.) oder G_1' (Siehe D.VI.) wird eingeengt und auf den Kationenaustauscher CM-Sephadex-C-50 aufgetragen. Beim Durchspülen des Gels mit Ausgangspuffer (0,02 M Phosphatpuffer) über viele Stunden kommt es zur Elution der Fraktionen K_1, K_2 und K_3. Die vom Kationenaustauscher gebundenen Makromoleküle werden durch einen kontinuierlich-linearen Phosphatpuffergradienten steigender Molarität desorbiert und erscheinen als Fraktion K_4. In jedem vierten Ausflussröhrchen wird die Osmolarität als Ausdruck für die zunehmende Ionenstärke gemessen. Die gewonnenen Fraktionen werden eingeengt, dialysiert gegen physiologische Kochsalzlösung (pH 7,4) und mit synthetischem Lysolecithin auf Enzymaktivität ausgetestet.
Abbildung 23 zeigt die Extinktionskurve bei Auftrennung von G_1 auf dem Kationenaustauscher CM-Sephadex-C-50, die Zunahme der Osmolarität in den Ausflussröhrchen nach Anlegen des Gradienten, sowie die Enzymaktivitäten in den Fraktionen K_1 bis K_4.

$E_{254\ nm}$ = Extinktion bei der Wellenlänge 254 nm.
K_1 - K_4: Fraktionen nach Auftrennung von G_1 auf CM-Sephadex-C-50.
Lysolecithinaseaktivität: µMol LL/mg Protein/Stunde bei 37^{o} und pH 7,4.

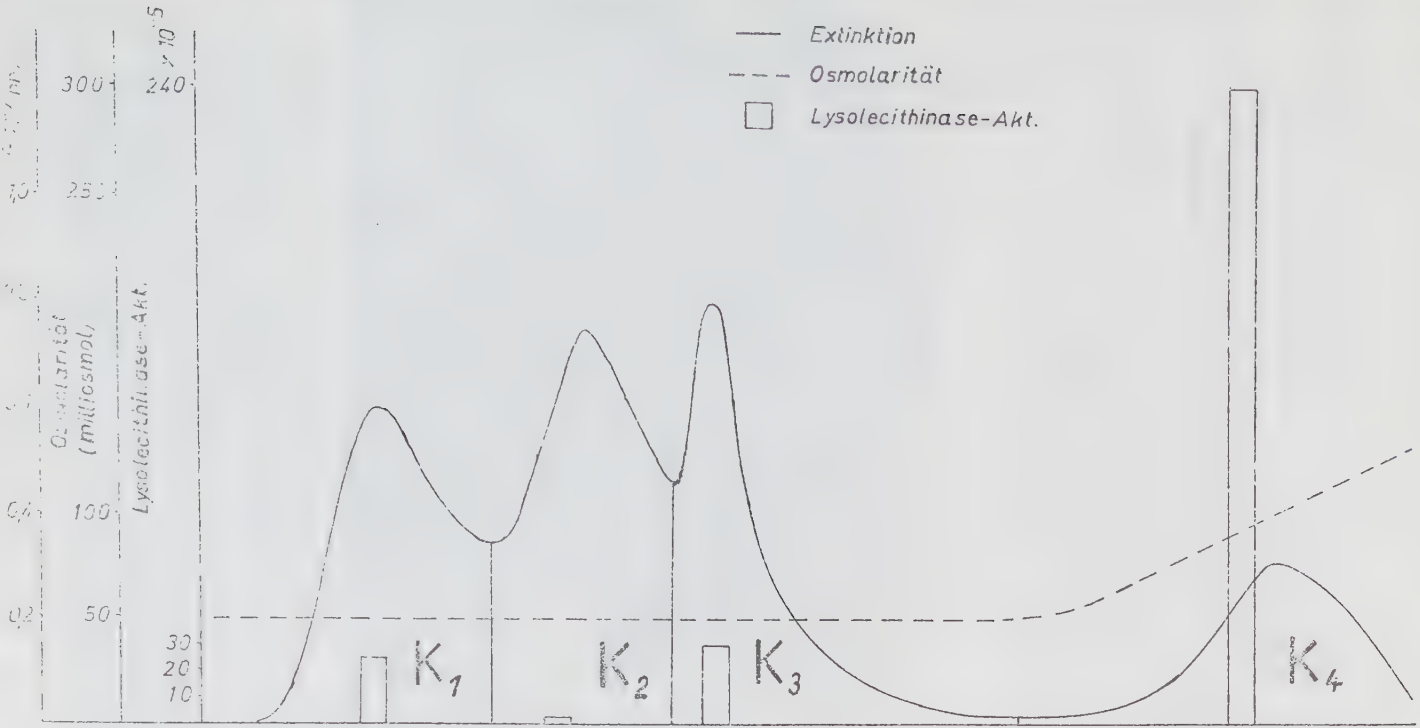


Abbildung 23: Auftrennung von G_1 auf CM-Sephadex-C-50.

Ergebnis: Lysolecithinaseaktivität ist in der Fraktion K_4 zu finden, die, nach Abspülen der nicht an das Säulenmaterial gebundenen Proteine mit 0,02 M Phosphatpuffer, durch Anlegen eines kontinuierlich-linearen Phosphatpuffergradienten steigender Molarität desorbiert wurde. In K_4 ist das Enzym um das 29-fache gegenüber Mischserum angereichert. Die geringen Aktivitäten in den übrigen Fraktionen sind zu vernachlässigen. Zur Charakterisierung des Lysolecithinaseproteins wurde eine Immunelektrophorese (Methode B.XVI.) von K_4 gelaufen:

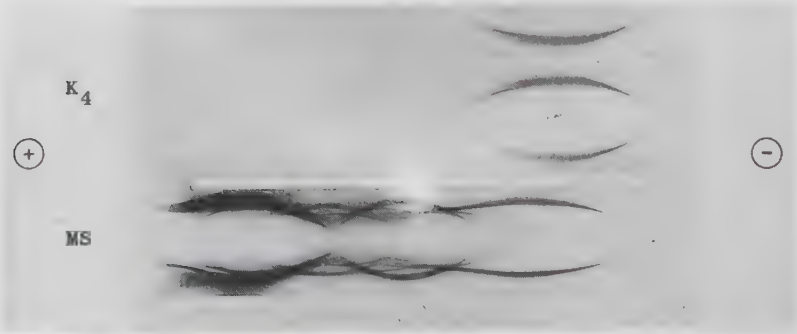


Abbildung 24 zeigt die Immunelektrophorese der enzymatisch aktiven Fraktion K_4 im Vergleich zu Mischserum.

K_4 = enzymatisch aktive Fraktion; 5 µl.
MS = Mischserum: Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung 2 : 1; 5 µl.
200 µl Antihumanserum vom Kaninchen.

Die Immunelektrophorese zeigt bei K_4 eine einzige Präzipitationslinie, welche der von γG-Globulinen entspricht. Die Ergebnisse der vorausgegangenen Versuche mit ihren Aussagen bezüglich des Molekulargewichts (Sephadex-G-200-superfine, F_1 + F_2: Molekulargewicht hoch, jedoch kleiner als 200 000) und der kationischen Ladung (Anionenaustauscher DEAE-Sephadex-A-50: G_1; Kationen austauscher CM-Sephadex-C-50: H_2) stimmen mit den Eigenschaften der bei der weiteren Anreicherung erhaltenen und sich als γG-Globulin darstellenden Fraktion K_4 überein: Molekulargewicht

um 150 000 streuend bei kationischer Wanderung.

D.VIII. Immunologische Identifizierung der Enzymfraktion K_4 mittels radialer Geldiffusion nach Ouchterlony

Die enzymatisch aktive Fraktion K_4, welche bei der Immunelektrophorese mit Antihumanserum eine Präzipitationsbande im Bereich der γ-Globuline ergibt, wird nun mittels spezifischer Antihumansera weiter charakterisiert. Dazu wird die Geldiffusion nach Ouchterlony (Methode B.XVII.) herangezogen. Als spezifische Antisera finden jene Anwendung, die im Bereich der γ-Globuline präzipitieren (101).

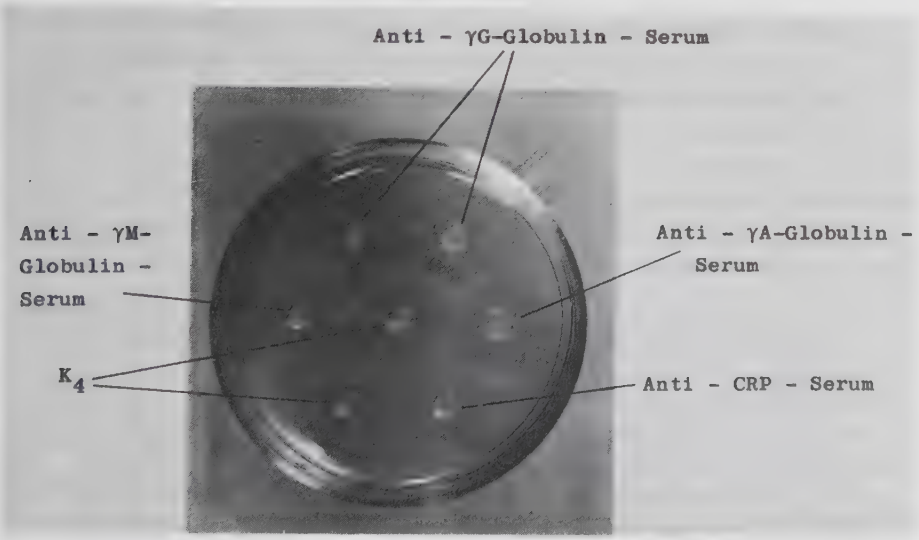


Abbildung 25: Geldiffusion (nach Ouchterlony) verschiedener spezifischer Plasmaprotein-Antisera gegen die angereicherte und enzymatisch aktive Fraktion K_4.

K_4 = Enzymfraktion: 5 µl.
Anti - γG-Globulin (- γA-Globulin, - γM-Globulin) - Serum vom Kaninchen: 5 µl.
Anti - CRP - Serum (Anti - C-reaktives-Protein - Serum) vom Kaninchen: 5 µl.

Ergebnis: Die Geldiffusion zeigt nur zwischen der Enzymfraktion K_4 und dem Anti - γG-Globulin - Serum Immunpräzipitation. Die Präzipitationslinien gehen lückenlos ineinander über und zeigen keine Spornbildung. Das Lysolecithin hydrolysierende Enzym ist somit den γG-Globulinen zuzuordnen.

D.IX.) II. Batch-Operation

Die enzymatisch aktiven Fraktionen G_1 und G_1' können durch eine II. Batch-Operation angereichert werden zur Fraktion K_4'.

1. Bereitung des Batchmaterials:

Die Herstellung des Materials für das II. Batch-Verfahren entspricht etwa jener der I. Batch-Operation. Ausgangssubstanz ist der Kationenaustauscher CM-Sephadex-C-50, der ähnlich dem DEAE-Sephadex-A-50 gewaschen wird. Nur die Reihenfolge von Natronlauge und Salzsäure im Waschvorgang wird vertauscht. Der Kationenaustauscher wird dann mit 0,02 M Phosphatpuffer (pH 7,4) äquilibriert und bei 4^{o} gelagert.

2. Batch-Prozess:

Nach dem Absetzen des gequollenen Gels wird die Oberphase vollständig abgesaugt und das zu fraktionierende G_1' oder G_1 (nach Dialyse gegen 0,02 M Phosphatpuffer) mit 1250 ml Kationenaustauscher vermengt. Nach dreistündigem Rühren im Kältelabor lässt man das Gel sich absetzen und dekantiert die Oberphase, welche Proteine enthält die nicht an das Gel gebunden worden sind. Das Gel wird mit 500 ml 0,02 M Phosphatpuffer für eine Stunde erneut verrührt und nach dem Absetzen die Oberphase wieder dekantiert und verworfen. Dies wird etwa noch weitere dreimal durchgeführt, bis die dekantierte Oberphase mit einer konz. Trichloressigsäurelösung keine Opaleszenz mehr zeigt. Nachdem nun alle nicht an den Kationenaustauscher gebundenen Proteine entfernt sind, werden die gebundenen mit 1 Liter 0,2 M Phosphatpuffer + 0,2 M Kochsalzlösung desorbiert, indem das Gel mit dem Puffer für eine Stunde vermischt wird. Durch anschliessendes Zentrifugieren erfolgt eine Trennung in Unterstand (proteinfreies Gel) und proteinhaltige wasserklare Oberphase. Der Überstand wird

dekantiert, filtriert und eingeengt. Die immunelektrophoretische Kontrolle zeigt die Präzipitationslinie von K_4.

D.X. Chromatographie der Fraktion K_4 mit Sephadex-G-150-superfine

Bei der K_4-Fraktion, in welcher das Enzym angereichert vorliegt, handelt es sich um γG-Proteine, deren Molekulargewicht um 150 000 streut (102,103,104,105). Da das "Gelsieb" Sephadex-G-150-superfine seine Ausschlussgrenze beim Molekulargewicht 150 000 hat, wurde eine Auftrennung von K_4 mittels Gelfiltration an Sephadex-G-150-superfine (Methode B.XXIII.) versucht unter optimalen Versuchsbedingungen: möglichst lange Säule, feine Körnung des Gels, kleines Auftragevolumen, scharfe Startbande, geringer Arbeitsdruck, niedrige Durchflussgeschwindigkeit.

Versuchsdaten:

Gelpackung: Länge 131 cm, Durchmesser 2,6 cm.
Puffer: 0,02 M Phosphatpuffer, pH 7,4.
Arbeitsdruck: $\leq$ 10 cm Wassersäule.
Ausflussvolumen: 3 ml/Stunde = 0,56 ml/cm^2/Stunde Durchflussvolumen.
Aufgetragenes Volumen: 3,5 ml K_4-Lösung.
Extinktionsbestimmung bei der Wellenlänge 254 nm am Uvicord.

Ergebnis: Bei einem Säulenlauf von 200 Stunden ergab sich nur ein Peak. Die Proteine der Fraktion K_4 liegen bezüglich ihres Molekulargewichts so eng, dass sie sich mittels des Molekülsiebeffektes nicht mehr trennen lassen: das Molekulargewicht der Lysolecithinase liegt also innerhalb der Streubreite der γG-Globuline.

D.XI. Ionenaustauschchromatographie der Fraktion K_4 am Kationenaustauscher Hydroxylapatit

Die immunologisch sich als γG-Globulin darstellende Fraktion K_4 soll durch eine weitere Kationenaustauschchromatographie weiter aufgetrennt werden. Dies wurde an Hydroxylapatit bei einem kontinuierlich-linearen Phosphatpuffergradienten steigender Molarität und einer pH-Änderung versucht (Methode B.XXIV.).

Nach dem Auftragen der Probe wurde die Säule mit Ausgangspuffer abgewaschen, um die unter den gegebenen Bedingungen nicht als Kationen vorliegenden Proteine zu entfernen. Die Extinktion änderte sich hierbei nicht: es liegen also in K_4 ausschliesslich Kationen vor, die sämtliche an das Säulenmaterial gebunden worden waren. Die Desorption und Elution dieser Kationen nach dem Gradientenprinzip liess, auch bei Wiederholung des Versuches, mehrere Unterfraktionen erkennen. Eine scharfe Abtrennung dieser Gruppen voneinander und selektive Austestung auf Lysolecithinaseaktivität war jedoch auf Grund der Konfluenz der Peaks nicht möglich.

Experimentelle Daten:
Säulenpackung: Länge 33 cm, Durchmesser 2,5 cm.
1 Liter Startpuffer: 0,005 M KH_2PO_4-Lösung + 0,2 M NaCl-Lösung.
1,5 Liter Grenzpuffer: 0,2 M Phosphatpuffer + 0,2 M NaCl-Lösung.
Phosphationen haben die spezifische Fähigkeit die Proteinadsorption an Hydroxylapatit zu drücken. Für die Bindung an die Säule ist die Anwesenheit von Neutralsalzen, z.B. NaCl, notwendig.
Ausflussvolumen: 30 ml/Stunde.
Extinktionsmessung bei der Wellenlänge 254 nm.

Ergebnis: In der Fraktion K_4 befinden sich ausschliesslich Kationen, die in ihrer Ladungsintensität so eng liegen, dass eine scharfe Auftrennung in weitere Fraktionen nicht möglich ist.

D.XII. Auftrennung der Fraktion K_4 an einer nach freien SH-Gruppen trennenden Säule

In der enzymatisch aktiven Fraktion K_4 befinden sich überwiegend Immunglobuline, welche keine freien Sulfhydrylgruppen besitzen (106). Die Lysolecithinase mit nachgewiesenen freien SH-Gruppen (Siehe C.VIII.) befindet sich ebenfalls in dieser Fraktion, sodass eine Auftrennung der immunelektrophoretisch sich als eine Präzipitationslinie darstellenden Fraktion K_4 mittels einer nach freien SH-Gruppen auftrennenden Säule versucht wurde (Methode B.XXV.).
Die durch zwei Batch-Prozesse (Siehe D.VI. und D.IX.) gewonnene Fraktion K_4 wurde gegen 0,02 M Phosphatpuffer (pH 7,4) dialysiert

und das Säulenmaterial (Organo-Quecksilber-Polysaccharid) mit dem gleichen Puffer äquilibriert. Die Säule wurde wie üblich gefüllt und eine Gelpackung von 20 cm x 2,5 cm mit dem Ausgangspuffer durchgespült. Nachdem die enzymatisch aktive Fraktion vollends auf die Säule aufgetragen worden war, wurde für 30 Minuten der Durchfluss gestoppt, um den Proteinen die Anheftung an das Säulenmaterial zu ermöglichen. Mit 0,02 M Phosphatpuffer wurden dann Proteine ohne freie SH-Gruppen von der Säule gewaschen und zur Fraktion M_1 vereinigt: "Nicht-SH-Fraktion". Mittels eines linearen Phosphatpuffergradienten steigender Molarität (400 ml Startpuffer: 0,02 M Phosphatpuffer, pH 7,4; 1 Liter Grenzpuffer: 0,2 M Phosphatpuffer, pH 7,4) wurde die Fraktion M_2 desorbiert: "SH-Fraktion". Eine 1 M Ammoniumsulfatlösung, die mit Ammoniak auf pH 7,4 eingestellt worden war, und eine 0,05 M Cystein-Lösung (6,06 g Cystein ad 1 Liter 0,02 M Phosphatpuffer, pH 7,4) führten zu keiner weiteren Elution von Proteinen. Cystein zeigte bei 254 nm eine Extinktion. Das Ausflussvolumen betrug 60 ml/Stunde.— Die "Nicht-SH-Fraktion" und die "SH-Fraktion" wurden eingeengt, gegen physiologische Kochsalzlösung (pH 7,4) dialysiert, mit synthetischem Lysolecithin als Substrat versetzt und teilweise bei 37° inkubiert, teilweise bei 4° gehalten.

Abbildung 25 zeigt den Extinktionsverlauf bei Auftrennung von K_4 auf einer nach Sulfhydrylgruppen fraktionierenden Säule, sowie die Lysolecithinaseaktivitäten in den Fraktionen M_1 und M_2.

$E_{254\ nm}$ = Extinktion bei der Wellenlänge 254 nm.
M_1 und M_2: proteinhaltige Fraktionen.
Lysolecithinaseaktivität: µMol LL/mg Protein/Stunde bei pH 7,4 und 37°.
Säulendimensionen: Länge 20 cm, Durchmesser 2,5 cm.
Ausflussvolumen: 60 ml/Stunde.
Phosphatpuffergradient: 400 ml Startpuffer: 0,02 M Phosphatpuffer, pH 7,4; Osmolarität: 50 milliosmol.
1 Liter Grenzpuffer: 0,2 M Phosphatpuffer, pH 7,4; Osmolarität: 400 milliosmol.

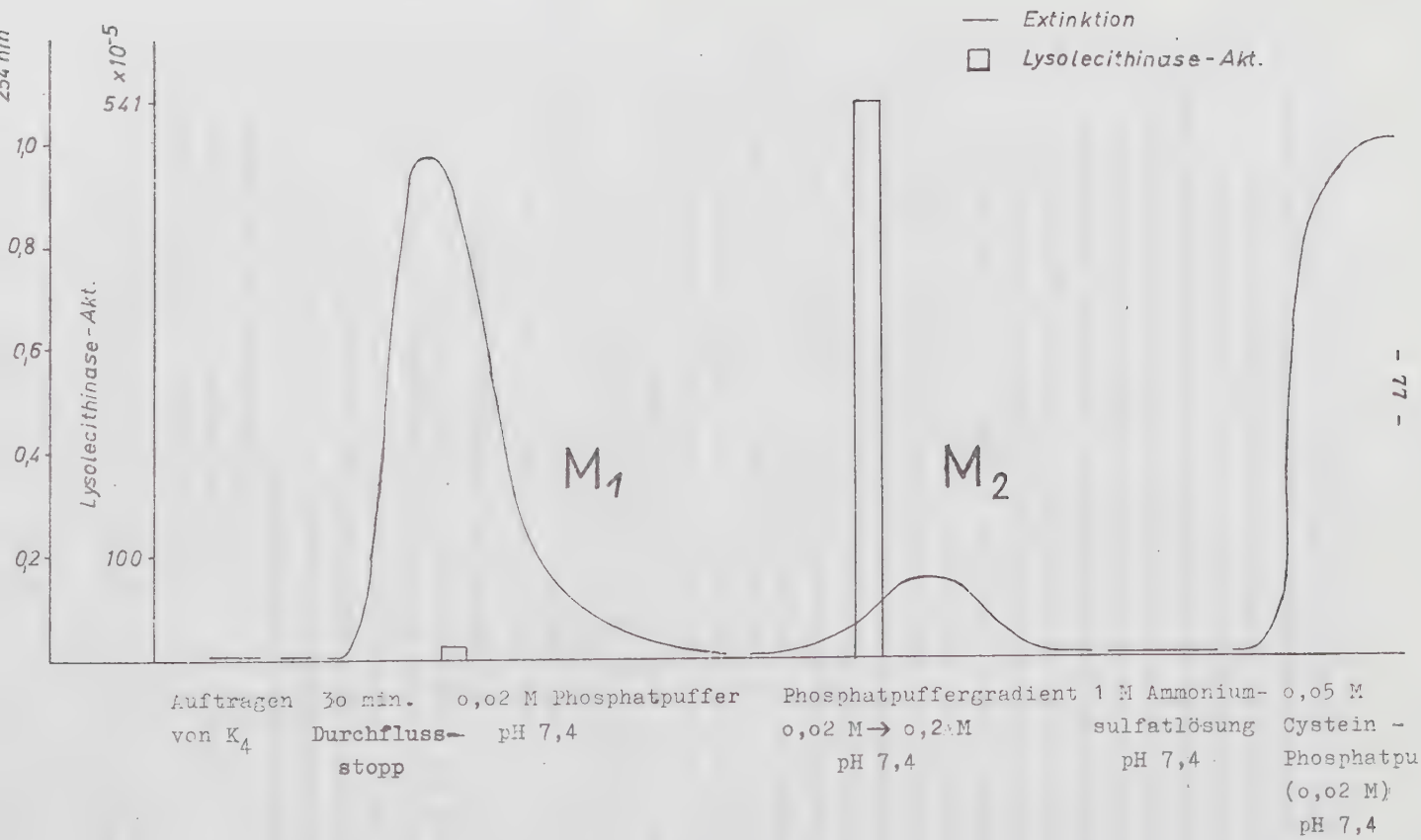


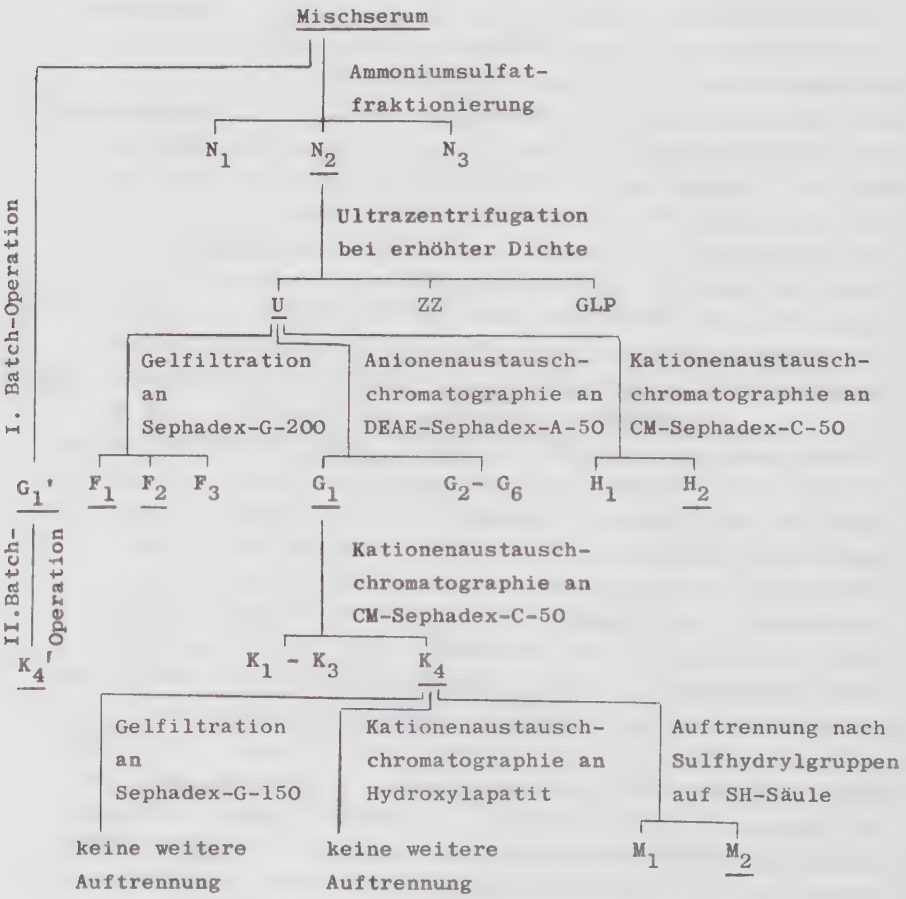
Abbildung 25: Auftrennung von K_4 auf einer nach freien SH-Gruppen fraktionierenden Säule.

Ergebnis: Die Fraktion K_4 lässt sich nach freien SH-Gruppen auftrennen in die Fraktion M_1 ("Nicht-SH-Fraktion") und M_2 ("SH-Fraktion"). Da Immunglobuline generell keine freien SH-Gruppen besitzen, dürften sie Hauptbestandteil von M_1 sein. K_4, die γG-Globulin - Fraktion, ist vor allem eine Antikörperfraktion, was den Proteinreichtum der Fraktion M_1 erklärt. SH-Proteine lassen sich als Fraktion M_2 mittels eines linearen Phosphatpuffergradienten steigender Molarität desorbieren. Lysolecithinaseaktivität ist lediglich in dieser "SH-Fraktion" nachzuweisen. Die Enzymanreicherung beträgt das 65,2-fache des Mischserums. Die geringe Enzymaktivität von M_1 ist bei Berücksichtigung der Fehlerbreite der Methode zu vernachlässigen. Mit 1 M Ammoniumsulfatlösung und 0,05 M Cystein-Lösung liess sich kein Protein mehr desorbieren, während Cystein selber bei der Wellenlänge 254 nm eine Extinktion zeigte.
Eine Aussage über die Anzahl von Sulfhydrylgruppen pro Molekül Enzym auf Grund des Desorptionsverhaltens lässt sich nicht geben, da nicht allein die aktuelle SH-Gruppenzahl, sondern auch das Molekulargewicht und die räumliche Struktur des Proteinmoleküls für die Desorption von der SH-Säule mitbestimmend sind.

Im Bemühen die Proteine der Fraktion M_1 und M_2 elektrophoretisch zu charakterisieren, wurde - nachdem Versuche mit der diskontinuierlichen Polyacrylamidgel-Elektrophorese (107,108) zu keinem befriedigendem Ergebnis führten - eine Agar-Elektrophorese von M_1 und M_2 im Vergleich zu K_4 und Mischserum folgendermassen densitometrisch ausgewertet: bei unterschiedlicher elektrophoretischer Beweglichkeit müssten die Konzentrationsmaxima der Proteine verschieden weit gewandert sein. Durch Einstellen verschiedener Empfindlichkeitsschwellen am Mikrodensitometer können die Konzentrationsmaxima der gewanderten Proteine als schlanke Gipfel aufgezeichnet werden, wobei die Lage ihrer Kulminationspunkte ein genaues Mass für die gewanderte Strecke darstellt. Zusätzlich können durch ein grosses Übersetzungsverhältnis des Schreibers geringste Unterschiede in der elektrophoretischen Beweglichkeit eruiert werden.
Ergebnis: Die Kulminationspunkte der Densitogramme von M_1, M_2, K_4 und der elektrophoretisch entsprechenden Proteinklasse des Mischserums liegen in einer gemeinsamen Front. Die

Fraktionen lassen sich hinsichtlich ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit nicht mehr unterscheiden, was auch zur Bezeichnung "Proteinfamilie der γG-Globuline" (109) führte.

D.XIII. Schema zur Anreicherung und teilweisen Charakterisierung der Phospholipase B (Lysolecithinase) des Humanserums



Anmerkung: Fraktionen mit Enzymaktivität sind im Schema unterstrichen.

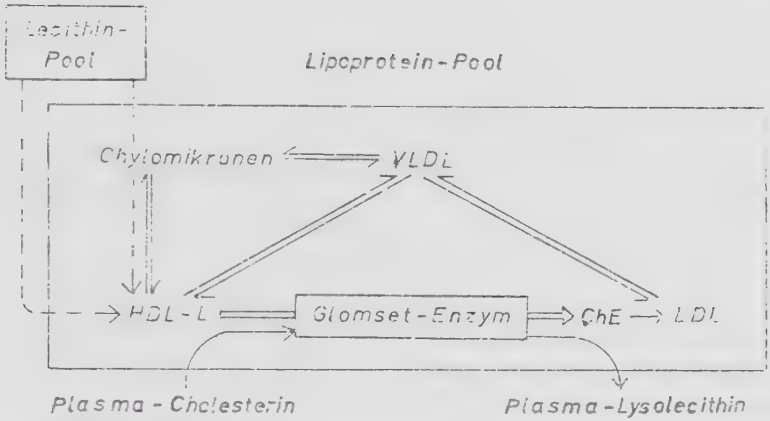
Die Anreicherung der Phospholipase B (Lysolecithinase) erfolgte auf das 65-fache des Mischserums bei einer Gesamtausbeute von 26 %.

E. Besprechung

Die zwei wichtigsten Lipoproteinklassen des Humanserums sind die High-Density-Lipoproteine (HDL) und die Low-Density-Lipoproteine (LDL), die folgendermassen aufgebaut sind (110,111,112,113,114):

	High-Density-Lipoprotein, HDL	Low-Density-Lipoprotein, LDL
Protein-Anteil	49 %	21 %
Lipid-Anteil:	51 %:	79 %:
Phospholipide	53 %	28 %
Cholesterinester	32 %	52 %
freies Cholesterin	6 %	8 %
Triglyzeride	9 %	12 %

Während bei den HDL der Proteinanteil gleich dem Lipidanteil ist, findet man bei den LDL eine Zunahme des Lipidgehaltes auf Kosten des Proteinanteils. Die Phospholipidzusammensetzung beider Lipoproteinklassen ist sehr ähnlich (115,116,117,118): Lecithin ist in den Phospholipiden der HDL und LDL zu 70 % vertreten. Auffallend ist jedoch die starke Reduzierung der Phospholipide in den LDL gegenüber den HDL und eine fast gleich grosse Zunahme an Cholesterinestern, während freies Cholesterin und Triglyzeride etwa in gleicher Menge vorkommen. Hieraus könnte man folgern, dass die Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase (LCAT, Glomset-Enzym), die eine Fettsäure von Lecithin auf Cholesterin unter Cholesterinesterbildung überträgt und deren Substrat die HDL (α_1-Lipoproteine) sind, die biochemische Verknüpfung zwischen High-Density-Lipoproteinen und Low-Density-Lipoproteinen darstellt, was im folgenden Schema erläutert werden soll.



HDL = High-Density-Lipoproteine
LDL = Low-Density-Lipoproteine
VLDL = Very-Low-Density-Lipoproteine
L = Lecithin
ChE = Cholesterinester
Glomset-Enzym: Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase, LCAT.
- - - - → : Lecithin-Transfer
⟸ : Cholesterinester-Transfer
⟹ : Acyltransferierung mit Bildung von Cholesterinestern

Lecithin wird nicht nur direkt an die HDL angelagert und fest gebunden, sondern auch durch Chylomikronen auf die HDL übertragen (119). Diese enthalten in ihrem phospholipidreichen Lipidanteil das Substrat für die Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase (LCAT, Glomset-Enzym), die aus Lecithin durch Acyltransferierung Cholesterinester bildet. Dieses Schlüsselenzym für die Veresterung des Plasmacholesterins vermittelt die biochemische Verknüpfung der lecithinreichen High-Density-Lipoproteine und cholesterinesterreichen Low-Density-Lipoproteine. Die neu synthetisierten Cholesterinester werden von den Low-Density-Lipoproteinen auf die übrigen Lipoproteinklassen übertragen (120,121,122). Auf diese Weise führen "Lipid-Transfer" und "Lipid-Austausch", sowie das Glomset-Enzym, zur Vernetzung der Lipoproteine.

Die gegenüber LDL gesteigerte Bindungsfähigkeit der HDL des Humanserums für Lecithin konnte für ^{32}P-Sojabohnenlecithin mittels Immunelektrophorese und Autoradiographie aufgezeigt werden (Siehe C.X.). Es ergab sich, dass die Bindung von Lecithin an die High-Density-Lipoproteine und Low-Density-Lipoproteine verschieden ist: Lecithin wird an die High-Density-Lipoproteine fest, an die Low-Density-Lipoproteine jedoch nur locker gebunden, Durch wiederholtes Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung wird die ^{32}P-Sojabohnenlecithin-LDL-Bindung gelöst, während die ^{32}P-Sojabohnenlecithin-HDL-Bindung stabil bleibt. Eine Aufklärung der Protein-Lipid-Bindung in den Lipoproteinen ist bisher noch nicht gelungen.

Die Enzyme für den Abbau von ^{32}P-Sojabohnenlecithin und ^{32}P-Sojabohnenlysolecithin im Humanserum zeigen verschiedene Hitzestabilität. Während die ^{32}P-Sojabohnenlysolecithin abbauende Phospholipase B (Lysolecithinase) zwischen 52° und 62° ihre Aktivität verliert, zeigt das ^{32}P-Sojabohnenlecithin hydrolysierende Enzym des Humanserums extreme Hitzefestigkeit: 20-minütiges Erhitzen auf 82° schränkt seine Aktivität nur um ca. 20 % ein (Siehe C.VI.). Diese Hitzestabilität findet man bei sämtlichen Phospholipasen A. Der Abbau von Lecithin im Serum erfolgt fast nur durch die Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase (LCAT, Glomset-Enzym), sodass die für alle Phospholipasen A (Lecithinase) typische Hitzestabilität auch auf das Glomset-Enzym zutrifft, bei dem neben der Acylhydrolasefunktion noch die Acyltransferierung vorliegt. - Durch Erhitzen einer enzymatisch aktiven, angereicherten Serumfraktion für 10 Minuten bei 57° wurde die Inaktivierung des mit der Blutkörperchensenkung ausgetesteten Lysolecithin freisetzenden Enzyms des Humanserums erreicht (88). Möglicherweise ist die beim Erhitzen von Mischserum auf 82° nur geringfügig eingeschränkte Aktivität der Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase durch Schutzproteine des Mischserums bedingt.

Phospholipide neigen im wässerigen Milieu zur Micellenbildung. Auf Grund der Micellenstruktur des Lecithins kann die Phospholipase A nicht an ihren Wirkort gelangen. Eine Micellenauflösung ist durch Gallensäuren und Diäthyläther leicht möglich, wobei die Ätherwirkung auf einer Fächerung der Micelle beruht, sodass dann die Enzymmoleküle an die ß-Position des Lecithins gelangen können. - Bei

der Gewinnung von markiertem Sojabohnenlysolecithin mit Phospholipase A aus Schlangengift wurde mit Diäthyläther eine Micellyse erreicht. Die bei der Enzymreaktion entstandenen Fettsäuren wurden mit Calcium-Ionen gebunden, sodass durch Verschiebung des enzymatischen Gleichgewichts das Lecithin nahezu vollständig abgebaut werden konnte (Siehe B.VIII.).
Neben dem ^{32}P-Sojabohnenlysolecithin fand synthetisches Lysolecithin als Substrat Verwendung, sowie das physiologischerweise im Humanserum vorkommende Lysolecithin (Lysolecithin a priori), welches durch das bei Inkubation von Mischserum aus dem Lecithin entstandene Lysolecithin (Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase, LCAT, Glomset-Enzym) noch vermehrt wurde: Lysolecithin aus Lecithin. Für das synthetische Lysolecithin wurde das Fehlen von Doppelbindungen in der veresterten Fettsäure nachgewiesen (Siehe C.XI.).
Albumin lagert Lysolecithin unter Bildung des Albumin-Lysolecithin-Komplexes an. Die Art der Komplexbindung ist noch ungeklärt.
Mit Hilfe einer Immunelektrophorese und Autoradioimmunelektrophorese eines mit ^{32}P-Sojabohnenlysolecithin präinkubierten Mischserums (Siehe C.X.) konnte gezeigt werden, dass Lysolecithin an Albumin nur locker gebunden wird. Während die Immunelektrophorese intensiv gefärbte Albuminbanden hat, ist in der Autoradiographie an den entsprechenden Stellen keine Schwärzung zu erkennen: mit physiologischer Kochsalzlösung liess sich das ^{32}P-Sojabohnenlysolecithin aus seiner Albuminbindung lösen. Unter identischen Versuchsbedingungen gelang es ^{32}P-Sojabohnenlecithin den Low-Density-Lipoproteinen wieder abzuspalten, sodass möglicherweise die Art der Bindung zwischen Albumin und ^{32}P-Sojabohnenlysolecithin ähnlich ist der Bindung des ^{32}P-Sojabohnenlecithins an die Low-Density-Lipoproteine.
Die Substratalterung im Mischserum bei 4° ist für ^{32}P-Sojabohnenlecithin und ^{32}P-Sojabohnenlysolecithin verschieden: während nach ca. 38 Tagen die Hälfte des eingesetzten ^{32}P-Sojabohnenlecithins hydrolytisch gespalten ist, sind für ^{32}P-Sojabohnenlysolecithin etwa 64 Tage nötig, d.h. etwa die doppelte Zeit (Siehe C.IX.). Aus diesen Daten ist zu entnehmen, dass eine hydrolytische Spaltung nicht bei der Glyzerin-Phosphorsäure-Esterbindung bzw. bei der Phosphorsäure-Cholin-Esterbindung der

Moleküle stattfindet, sondern bei ^{32}P-Sojabohnenlecithin und ^{32}P-Sojabohnenlysolecithin die Alterung eine Fettsäurehydrolyse ist.

Es ist bekannt, dass es während der Schwangerschaft zu einer fortschreitenden Abnahme des Lysolecithins im mütterlichen Plasma kommt (123,124,125). Bei schwangeren Rhesusaffen konnte als Ursache ein Anstieg der Lysolecithinaseaktivität im Plasma eruiert werden (126). Dieser Befund ist auch bei schwangeren Frauen zu erheben (Siehe C.II.): am Ende der Schwangerschaft findet man eine erhöhte Lysolecithinaseaktivität im Plasma und eine resultierende Erniedrigung der Lysolecithinkonzentration. Bei einer Kontrolle 7 Tage nach der Geburt waren die Lysolecithinaseaktivität und der Lysolecithinspiegel im Plasma wieder auf den Ausgangswerten angelangt. - Bei einer Schwangerschaftsdauer des Rhesusaffen (Macaca mulatta) von 165 Tagen fand man einen signifikanten Anstieg der Enzymaktivität, begleitet von einem Abfall der Lysolecithinkonzentration, ab dem 42. Tag der Schwangerschaft. Zwei Tage post partum hatte der Lysolecithinspiegel im Serum bereits wieder seinen Ausgangswert erreicht. Das anatomische Substrat für die Zunahme der Lysolecithinaseaktivität in der Schwangerschaft ist in der Placenta zu suchen (127,128,129). Wurde durch eine sectio caesaria Fetus und Placenta gleichzeitig entfernt, so fand sich innerhalb von wenigen Stunden ein starker Abfall der Enzymaktivität im mütterlichen Blut. Wurde nur der Fetus entfernt und die Placenta in situ gelassen, so blieb die Plasma-Lysolecithinaseaktivität erhöht. Nach Entfernung der retinierten Placenta zeigte die Enzymaktivität im mütterlichen Plasma ein rapides Absinken (130). Lysolecithinaseaktivität konnte durch Organaufarbeitung in der Placenta nachgewiesen werden, wobei die Enzymaktivität in der Placenta bedeutend höher war als in der Leber (126), in der Phospholipase B-Aktivität bereits nachgewiesen worden war (132). - Es stellt sich die Frage, ob die von der Placenta gebildete Phospholipase B identisch ist mit der in der vorliegenden Arbeit charakterisierten und angereicherten Lysolecithinase und welchen Einfluss Schwangerschaftshormone auf die Enzymaktivität haben. Möglicherweise gibt es neben der im Serum von Männern und Frauen vorkommenden Phospholipase B (Lysolecithinase) noch

eine von der Placenta gebildete "Schwangerschaftslysolecithinase".

Die biologischen Wirkungen von Lysolecithin sind auf die Membran der Zelle ausgerichtet und bestehen bei höherer Konzentration in einer Zellschädigung. Die Elimination dieses autotoxischen Metaboliten durch die Lysolecithin abbauende Phospholipase B (Lysolecithinase) im Humanserum ist daher als Schutzmechanismus des Körpers vor einer schädlichen Konzentrationserhöhung anzusehen.

F. Zusammenfassung

1. Bei der Inkubation von Humanserum wird Lecithin abgebaut zu Lysolecithin (Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase, LCAT, Glomset-Enzym). Durch die Wirkung der Lysolecithinase des Serums (Phospholipase B), welche Lysolecithin weiter hydrolytisch zu Glycerylphosphorylcholin (GPC) und Fettsäure spaltet, ist die Neubildung an Lysolecithin geringer als die Lecithinabnahme.
2. Frauen haben im Serum im Vergleich zu Männern eine geringere Lysolecithinkonzentration bei gesteigerter Phospholipase B-Aktivität. Während es in der Schwangerschaft zu einer Zunahme der Enzymaktivität mit adäquater Lysolecithinverminderung kommt, sind acht Tage post partum die ursprünglichen Ausgangswerte wiederhergestellt.
3. Bis zu einer Inkubationsdauer von 20 Stunden nimmt die Lysolecithinkonzentration ab, während die wasserlöslichen Phosphorverbindungen und freien Fettsäuren zunehmen.
4. Die Lysolecithinase hat ihr pH-Optimum im physiologischen Bereich. Sie wird durch 6 M Harnstoff irreversibel denaturiert.
5. Die Phospholipase B (Lysolecithinase) verliert durch 20-minütiges Erwärmen ihre Enzymaktivität zwischen 52° und 62°, während die Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase (LCAT, Glomset-Enzym) durch gleichdauerndes Erhitzen auf 82° nur eine geringe Aktivitätseinbusse erfährt.
6. Die Phospholipase B des Humanserums hat essentielle freie Sulfhydrylgruppen (SH-Enzym). Sie gehört zu den γG-Globulinen und hat ein Molekulargewicht von ca. 150 000 (Sephadex-G-150-Säulenchromatographie).
7. ^{32}P-Sojabohnenlecithin altert im Serum bei 4° etwa doppelt so schnell als ^{32}P-Sojabohnenlysolecithin. Die Halbwertszeit der Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase beträgt 8 Tage, die der Lysolecithinase 23 Tage.
8. Die Phospholipase B (Lysolecithinase) des Humanserums wurde durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung von Mischserum, Ultrazentrifugation bei erhöhter Dichte, Anionenaustausch-

chromatographie an DEAE-Sephadex-A-50, Kationenaustausch-chromatographie an CM-Sephadex-C-50 und durch eine nach freien Sulfhydrylgruppen trennende Säule auf das 65-fache des Mischserums angereichert bei einer Gesamtausbeute von 26 %.

9. Synthetisches Lysolecithin hat in seiner einzigen Variablen, der veresterten Fettsäure, keine Doppelbindung.

10. ^{32}P-Sojabohnenlecithin wandert immunelektrophoretisch mit den High-Density-Lipoproteinen (HDL, α_1-Lipoproteine) und den Low-Density-Lipoproteinen (LDL, ß-Lipoproteine). Die Bindung des ^{32}P-Sojabohnenlecithins an beide Lipoproteinklassen ist jedoch verschieden: an die High-Density-Lipoproteine wird ^{32}P-Sojabohnenlecithin fest gebunden, während es an die Low-Density-Lipoproteine nur locker angelagert wird. - Das ^{32}P-Sojabohnenlysolecithin ist im Humanalbumin-Lysolecithin-Komplex locker und leicht abspaltbar gebunden.

G. Literaturverzeichnis

1) Hanahan D.J.: J. Biol. Chem. 211 (1954), 313.
2) Lands W.E.M.: J. Biol. Chem. 235 (1960), 2233.
3) Lands W.E.M., Merkl J.: J. Biol. Chem. 238 (1963), 898.
4) Robertson A.F.: Biochim. Biophys. Acta 116 (1966), 379.
5) Schettler D.J.: Lipids and Lipidoses, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York, 1967.
6) Renkonen O., Hirvisalo E.L.: Acta chem. Scand. 19 (1965), 1022.
7) Tattrie N.H., Cyr R.: Biochim. Biophys. Acta 70 (1963), 693.
8) Hanahan D.J., Brockerhoff H., Barron E.J.: J. Biol. Chem. 235 (1960), 1917.
9) Glomset J.A.: J. Lipid Research 9 (1968), 155.
10) Glomset J.A., Parker F., Tjaden M., Williams R.H.: Biochim. Biophys. Acta 58 (1962), 398.
11) Collier H.B., Chen H.L.: Can. J. Research E 28 (1950), 289.
12) Saunders L.: J. Pharm. Pharmacol. 9 (1957), 834.
13) Thomas J.L., Saunders L.: J. Pharm. Pharmacol., Suppl. 10 (1958), 182 T.
14) Lucy J.A.: Nature 227 (1970), 815.
15) Klibansky C., De Vries A.: Biochim. Biophys. Acta 70 (1963), 176.
16) Greig M.E., Gibbons A.J.: Arch. Biochem. Biophys. 61 (1956), 343.
17) Mann Th.: The Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract, London: Methnen + Co Ltd. (1964).
18) Mehrishi J.N., Cater D.B., Hartveit F.: Acta Pathol. Microbiol. Scand. 74 (1968), 141.
19) Adlkofer F., Ketnath H.-J., Uher L., Ruhenstroth-Bauer G.: Blut 19 (1969), 321.
20) Collier H.B,: Fed. Proc. 6 (1947), 245.
21) Kates M., Allison A.C., James A.T.: Biochim. Biophys. Acta 48 (1961), 571.
22) Ruhenstroth-Bauer G.: Klin. Wochenschrift 44 (1966), 533.
23) Kyes P.: Berlin. klin. Wschr. 40 (1903), 956.
24) Keller R.: Helvet. Physiol. Acta 22 (1964), C 24.
25) Middleton E., Phillips G.B.: J. Lab. Clin. Med. 64 (1964), 889.
26) Kirschmann Ch., Aloof S., de Vries A.: Thromb. Diath. Haemorrh. 9 (1963), 512.

27) Burdzy K., Munder P.G., Fischer H., Westphal O.: Z. Naturforschung 19 b (1964), 1118.
28) Poole A.R., Howell J.J., Lucy J.A.: Nature 227 (1970), 810.
29) Steffen C.: Allgemeine und experimentelle Immunologie und Immunpathologie, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1968.
30) Fischer H., Haupt J.: Z. Naturforschung 16 b (1961), 321.
31) Haupt J., Fischer H., Rother U., Rother K.: Nature 200 (1963), 686.
32) Van Oss C.J., Cixous N.: Naturwissenschaften 50 (1963), 500.
33) Rother K., Rother U., Müller-Eberhard H., Nilsson U.: J. exp. Med. 124 (1966), 773.
34) Schiebel W.: Dissertation Universität München (1966).
35) Klibansky Ch., Condrea E., De Vries A.: Am. J. Physiol. 203 (1962), 114.
36) Oliveira M.M., Vaughan M.: Fed. Proc. 21 (1962), 296.
37) Robertson A.F., Lands W.E.M.: J. Lipid Research 5 (1964), 88.
38) Mulder E., Van Den Berg J.W.O., Van Deenen L.L.M.: Biochim. Biophys. Acta 106 (1965), 118.
39) Habermann E., Bandtlow G., Krusche B.: Klin. Wschr. 39 (1961), 816.
40) Birkhofer G.: Dissertation Universität München (1969).
41) Zöllner N., Eberhagen D.: Untersuchung und Bestimmung der Lipoide im Blut, Springer-Verlag (1965).
42) Zahler P.: Zschr. f. klin. Chem. und klin. Biochem. 5 (1967), 191.
43) Stahl E.: Dünnschichtchromatographie (ein Laboratoriumshandbuch), 2. Aufl. 1967, Springer-Verlag.
44) Fiske C.H., Subbarow y.: J. Biol. Chem. 66 (1925), 375.
45) Bartlett G.R.: J. Biol. Chem. 234 (1959), 466.
46) Hölzl J., Chatterjee M., Hörhammer L.: Biochem. Z. 340 (1964), 400.
47) Hölzl J., Wagner H.: Z. Naturforschung 26 b (1971), 425.
48) Rhodes D.N., Lea C.H.: Biochem. J. 65 (1957), 526.
49) Rouser G., Kritchevsky G., Heller D., Lieber E.: The Journal of the American Oil Chemists' Society 40 (1963), 425.
50) Klenk E., Debuch H., Eikermann H., Lappe G.: United States Patent Office 3031, 478 (1962).
51) Auerswald W., Bornschein H.: Wien. Zschr. inn. Med. 30 (1949), 248.
52) Bauer H., Angelstein J.: Klin. Wschr. 30 (1952), 277.
53) Dittebrandt M.D.: Americ. J. Clin. Pathol. 18 (1948), 439.
54) Weichselbaum T.E.: Amer. J. Clin, Pathol. 10 (1946), 49.

55) Westergren A.: Ergebn. inn. Med. 26 (1924), 577.
56) Dúncombe W.G.: Clin. chim. Acta 9 (1964), 122.
57) Boehringer Mannheim GmbH,: Test-Fibel Klinik und Labor.
58) Ancker E.: Dissertation Universität München (1969).
59) Amicon Corporation, Scintific Systems Division, Oosterhout N.B./Holland: Operating Instructions.
60) Grabar P., Williams C.A.: Biochim. Biophys. Acta 10 (1953), 193.
61) Scheidegger J.J.: Int. Arch. Allergy appl. Immunol. 7 (1955), 103.
62) Backhausz R.: Immundiffusion und Immunelektrophorese, VEB Gustav Fischer Verlag, 1967.
63) Schneider W., Berndt H.: Praktikum und Atlas der Immunelektrophorese, J.F. Lehmanns Verlag München (1969).
64) Ouchterlony Ö.: Arkiv för kemi 1, (1949), 43.
65) Ouchterlony Ö.: Progr. Allergy 5, (1958), 1.
66) Behringwerke AG, Höchst AG: Laboratoriumsblätter für die med. Diagnostik (1965).
67) Taylor,J.F., Neurath H.N.: The Proteins I. (1953), 55.
68) Schiebel W., Nass G., Eulitz M., Ruhenstroth-Bauer G.: Hoppe-Seyler's Z. f. Physiol. Chem. 338 (1964), 198.
69) De Lalla O.F., Gofman J.W.: Methods biochem. Analysis 1 (1954), 459.
70) Korn E.D.: Methods biochem. Analysis 7 (1959), 145.
71) Lindgreen F.T., Nichols A.V., Putnam F.W.: Plasma Proteins II, Academic Press New York, (1960), 4.
72) Flodin P., Killander J.: Biochim. biophys. Acta 63 (1962), 403.
73) Flodin P.: Dextran Gels and their Application in Gelfiltration, Pharmacia Uppsala (1962).
74) Porath J., Flodin P.: Nature 183 (1959), 1657.
75) Killander J.: Biochim. biophys. Acta 93 (1964), 1.
76) Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala Schweden: Sephadex-Gelfiltration in Theorie und Praxis.
77) Gelotte B., Flodin P., Killander J.: Arch. biochim, biophys., Suppl. 1 (1962), 319.
78) Steffen C.: Allgemeine und experimentelle Immunologie und Immunpathologie, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1968.
79) Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala Schweden: Sephadex-Ionenaustauscher, Leitfaden zur Ionenaustauschchromatographie.
80) Tiselius A., Hjerten S., Levin Ö.: Arch. Biochem. Biophys. 65 (1956), 132.

81) Anacker W.F., Stoy V.: Biochem. Z. 330 (1958), 141.
82) Levin Ö.: Methods in Enzymology 5 (1962), 27.
83) Eldjarn L., Jellum E.: Acta chem. Scand. 17 (1963), 2610.
84) Jellum E.: Acta chem. Scand. 18 (1964), 1887.
85) Wissenschaftliche Tabellen, Documenta Geigy, J.R. Geigy AG, Pharma, Basel, 7. Aufl., 554.
86) Wintrobe M.M.: Clinic. Hematol., 5. Aufl., Lea + Febiger, Philadelphia (1961), 325.
87) Katz, Leffkowitz: Ergebn. inn. Med. Kinderheilk. 33 (1928), 266.
88) Adlkofer F., Schiebel W., Ancker E., Ruhenstroth-Bauer G.: Hoppe-Seyler's Z. f. Physiol. Chem. 349 (1968), 417.
89) Wissenschaftliche Tabellen, Documenta Geigy, J.R. Geigy AG, Pharma, Basel, 7. Aufl., 413.
90) Woelk H,, Debuch H.: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 352 (1971), 1275.
91) Wells M.A., Hanahan D.J.: Methods in Enzymol., Vol. XIV Lipids (1969), Academ. Press New York and London, 178.
92) Magee W.L., Uthe J.F.: Methods in Enzym., Vol. XIV Lipids (1969), Academ. Press New York and London, 170.
93) Naturwissenschaftliche Rundschau, 25. Jahrg., Heft 1 (1972), 33.
94) Hölzl J., Wagner H.: Z. Naturforschung 26 b (1971), 425.
95) Switzer S., Eder H.A.: J. Lipid Res. 6 (1965), 506.
96) Klopfenstein W.E.: Biochim. Biophys. Acta 187 (1969), 272.
97) Baumstark J.S., Laffin R.J., Bardawil W.A.: Arch. Biochem. Biophys. 108 (1964), 514.
98) Perper R.J., Okimoto J.T., Cochrum K.C., Ramsey N., Najarian J.S.ß Proc. Soc. exptl. Biol. Med. 125 (1967), 575.
99) James K., Stanworth P.R.: J. Chromatogr. 15 (1964), 324.
100) Peterson E.A., Chiazze E.A.: Arch. Biochem. Biophys. 99 (1962),136.
101) Schultze H.E., Heremans J.F.: Molekular Biology of Human Proteins, Vol. 1: Nature and Metabolism of Extracellular Proteins. Elsevier Publishing Company, Amsterdam (1966).
102) Cohn E.J., Gurd F.R.N., Surgenor D.M., Barnas B.A., Brown R.K., et al.: J. Amer. chem. Soc. 72 (1950), 465.
103) Oncley J.L., Scatchard G., Brown A.: J. Phys. coll. Chem. 51 (1947), 184.

104) Phelps R.A., Putnam F.W.: The Plasma Proteins I, (1960), 143.
105) Schultze E.H., Schmidtberger R., Haupt H.: Biochem. Z. 329 (1958), 490.
106) Rank W.R.: persönliche Mitteilung
107) Ornstein L.: Annals N.Y. Acad. Sci. 121 (1964), 321.
108) Isichel U.P.: Med. Dissertation Universität München (1966).
109) Maurer R.: Disk-Elektrophorese, Walter de Gruyter + Co Verlag, 1968.
110) Oncley J.L.: Lipid protein interactions, p. 1-17. In: Folch J. and Bauer H.: Brain Lipids and Lipoproteins and the Leucodystrophies. Amsterdam: Elsevier (1963).
111) Bragdon J.H., Havel R.J., Boyle E.: J. Lab. clin. Med. 48 (1956), 36
112) Seidel D., Sailer S.: XIX. Internationaler Fortbildungskongress der Bundesärztekammer, Meran 1971.
113) Irsigler K., Klemens U.: Prakt. und klin. Bedeutung des Fettstoffwechsels, Boehringer Mannheim.
114) Olson, Vester: Physiol. Rev. 40 (1960), 677.
115) Phillips G.B.: J. clin. Invest. 38 (1959), 489.
116) Nelson G.J., Freeman N.K.: J. biol. Chem. 235 (1960), 578.
117) Phillips G.B.: Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 100 (1959), 19.
118) Sanbar S.S., Alaupovic P.: Biochim. Biophys. Acta 71 (1963), 235.
119) Zilversmit D.B. in Frazer A.C.: Biochemical Problems of Lipids. Amsterdam: Elsevier 1963.
120) Rehnborg C.S., Nichols A.V.: Biochim. Biophys. Acta 84 (1964), 596.
121) Nichols A.V., Smith L.: J. Lipid Res. 6 (1965), 206.
122) Cornwell D.G., Horrocks L.A.: Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 107 (1961), 296.
123) Vikrot O.: Acta Med. Scand. 175 (1964), 443.
124) Vikrot O.: Acta Med. Scand. 178 (1965), 745.
125) Eisenberg S., Stein Y., Stein O.: Biochim. Biophys. Acta 137 (1967), 115.
126) Portman O.W., Soltys P., Alexander M., Behrman R.E.: Biochim. Biophys. Acta 167 (1968), 610.
127) Winkler L.: Die Naturwissenschaften 51 (1964), 340.
128) Marples E.A., Thompson R,H.S.: Biochem. J. 74 (1960), 123.
129) Winkler L.: Z. Physiol. Chem. 333 (1963), 199.
130) Behrman R.E., Parer J.T., De Lannoy C.W.: Nature 214 (1967), 678.
131) Humphrey J.H., White R.G.: Lehrbuch der Immunologie, Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart (1971), 126.
132) Dawson R.M.C.: The Biochem. J. 64 (1956), 192.

Ausbildungsweg

Am 30. Juni 1941 wurde ich in Plattling/Bayern geboren. Ich besuchte die dortige Volksschule und trat dann an die Oberrealschule Deggendorf über, an der ich 1961 maturierte. Im vorklinischen Teil des Studiums der Humanmedizin war ich an der Universität Erlangen-Nürnberg immatrikuliert, im klinischen an den Universitäten Zürich und München. Im Frühjahr 1969 beendete ich das Staatsexamen in Humanmedizin an der Universität München. Den praktischen Teil der Ausbildung absolvierte ich als Famulus an der I. Medizinischen Universitätsklinik München, an der Chirurgischen Universitätsklinik Bari (Italien), sowie an der University of Tennessee in Memphis/USA. An der Medizinischen Abteilung des Bezirksspitals Thun/Schweiz und an der Chirurgischen Universitätsklinik München war ich als Medizinalassistent tätig. Seit September 1969 bin ich am Max-Planck-Institut für Biochemie in München beschäftigt.